(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-518388
(P2012-518388A)
(43)公表日　平成24年8月16日(2012.8.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 1/20	(2006.01)	C12N	1/20	ZNAA	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B064
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B065
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	Z	4C076
A61K 39/02	(2006.01)	A61K	39/02		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 69 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-550380 (P2011-550380)
(86)(22)出願日　平成22年2月17日 (2010.2.17)
(85)翻訳文提出日　平成23年9月9日 (2011.9.9)
(86)国際出願番号　PCT/AU2010/000172
(87)国際公開番号　WO2010/094064
(87)国際公開日　平成22年8月26日 (2010.8.26)
(31)優先権主張番号　2009900736
(32)優先日　平成21年2月20日 (2009.2.20)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　509336266
オーストラリアン　ポールトリー　シーアールシー　ピーティーワイ　リミテッド
オーストラリア国　２３５１　ニュー　サウス　ウェールズ，アーミデイル，ユニバーシティ　オブ　ニュー　イングランド，ジオグラフィー　ロード，ビルディング　ダブリュ２１
(74)代理人　100106002
弁理士　正林　真之
(74)代理人　100120891
弁理士　林　一好

最終頁に続く

(54)【発明の名称】弱毒生ワクチン

(57)【要約】
本発明は、少なくとも１つのＡＢＣトランスポーター遺伝子の変異によって弱毒化された細菌であって、この変異は対応するＡＢＣトランスポータータンパク質を非機能的にし、この弱毒細菌は対象の中で生き残る、細菌に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも１つのＡＢＣトランスポーター遺伝子の変異によって弱毒化された細菌であって、前記変異は、対応するＡＢＣトランスポータータンパク質を非機能的にし、前記弱毒細菌は対象の中で生き残ることができる、細菌。
【請求項２】
前記変異は、挿入、欠失、置換またはこれらのいずれかの組み合わせによって生成される、請求項１に記載の細菌。
【請求項３】
前記挿入変異は、相同組み換え、トランスポゾン変異または配列タグ変異誘発のいずれか１つまたはそれらのいずれかの組み合わせによってもたらされる、請求項２に記載の細菌。
【請求項４】
前記ＡＢＣトランスポーター遺伝子は、ＡＢＣペプチドトランスポータータンパク質をコードする、請求項１に記載の細菌。
【請求項５】
前記ＡＢＣペプチドトランスポーター遺伝子は、ＣｖａＢ、ＣｙｌＢ、ＳｐａＢ、ＮｉｓＴ、ＥｐｉＴ、ＣｏｍＡ、ＰｅｄＤ、ＬｃｎＣ、ＭｃｂＥＦ、ＯｐｐＤおよびＤｐｐＤ、およびこれらの相同体を含む群から選択される、請求項４に記載の細菌。
【請求項６】
前記ＡＢＣトランスポーター遺伝子はＯｐｐＤである、請求項５に記載の細菌。
【請求項７】
前記細菌は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ（アビバクテリウム）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（バチルス）、Ｂｒｕｃｅｌｌａ（ブルセラ）、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ（バルトネラ）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ（ボルデテラ）、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ（バークホルデリア）、Ｖｉｂｒｉｏ（ビブリオ）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（大腸菌類、エシェリキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（サルモネラ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ（クロストリジウム）、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ（カンピロバクター）、Ｃｈａｌｍｙｄｉａ（クラミジア）、Ｃｏｘｉｅｌｌａ（コクシエラ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ（エリシペロスリクス）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ（フランシセラ）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ（リステリア）、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ（アクチノバチルス）、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ（ヘモフィルス）、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ（ヘリコバクター）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ（エロモナス）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ（ストレプトコッカス、連鎖球菌）、Ｓｈｉｇｅｌｌａ（赤痢菌）、Ｙｅｒｓｉｎｉａ（エルシニア）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（マイコバクテリウム）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ（マンヘミア）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（オルニソバクテリウム）、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ（リケッチア）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ（ウレアプラズマ）、およびＰａｓｔｅｕｒｅｌｌａ（パスツレラ）を含む群から選択される、請求項１に記載の細菌。
【請求項８】
前記細菌は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｇａｌｌｉｎａｒｕｍ（アビバクテリウム・パラガリナルム）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ａｖｉｕｍ（ボルデテラ・アビウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅａｌｅ（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ（腸炎菌）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ（パスツレラ・マルトシダ）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ（マンヘミア・ヘモリチカ、ヘモリチカ菌）、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ（クロストリジウム・パーフリンジェンス、ウェルシュ菌）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｇａｌａｃｔｉａｅ（マイコプラズマ・アガラクチアエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｋａｌｅｓｃｅｎｓ（マイコプラズマ・アルカレッセンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎａｔｉｓ

（マイコプラズマ・アナティス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎｓｅｒｉｓ（マイコプラズマ・アンセリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｍｉｔａｎｓ（マイコプラズマ・イミタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｇｉｎｉｎｉ（マイコプラズマ・アルギニニ）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｐａｒｖｕｍ（ウレアプラズマ・パルハム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ（マイコプラズマ・アルスリチジス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ボビゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ボビリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｓ（マイコプラズマ・ボビス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ（マイコプラズマ・ボーボクリ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃｕｍ（マイコプラズマ・カリフォルニカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｒｉｃｏｌｕｍ（マイコプラズマ・カプリコルム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｄｉｓｐａｒ（マイコプラズマ・ディスパー）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・フェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ（マイコプラズマ・ファーメンタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｏｍｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ホミニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ハイオリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオシノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｏｗａｅ（マイコプラズマ・アイオワエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｌａｒｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ａｎｄ ｓｍａｌｌ ｃｏｌｏｎｙ（マイコプラズマ・ミコイデス ミコイデス大コロニー型および小コロニー型）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｒａｌｅ（マイコプラズマ・オラーレ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓ（マイコプラズマ・ペネトランス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｖｉｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・オビニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｕｌｌｏｒｕｍ（マイコプラズマ・プローラム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｌｉｇａｔｏｒｕｓ（マイコプラズマ・アリガトラス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ニューモニエ、肺炎マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍａｌｅａｇｒｉｄｉｓ（マイコプラズマ・メレアグリディス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・ヘモフェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｍｉｎｕｔｕｍ（マイコプラズマ・ヘモマイニュータム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍａｔｏｐａｒｖｕｍ（マイコプラズマ・ヘマトパルハム）である、請求項７に記載の細菌。

【請求項９】

前記細菌は、トリ病原性大腸菌株Ｅ９５６、またはＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）株Ａｐ３ＡＳである、請求項８に記載の細菌。

【請求項１０】

前記弱毒細菌は異種抗原を発現する、請求項１から請求項９のいずれか１項に記載の細菌。

【請求項１１】

前記異種抗原は、同じまたは別の病原生物のいずれか由来の核酸によってコードされる、請求項１０に記載の細菌。

【請求項１２】

前記異種抗原をコードする核酸は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ（アビバクテリウム）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（バチルス）、Ｂｒｕｃｅｌｌａ（ブルセラ）、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ（バルトネラ）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ（ボルデテラ）、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ（バークホルデリア）、Ｖｉｂｒｉｏ（ビブリオ）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（大腸菌類、エシェリキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（サルモネラ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ（クロス

トリジウム）、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ（カンピロバクター）、Ｃｈａｌｍｙｄｉａ（クラミジア）、Ｃｏｘｉｅｌｌａ（コクシエラ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ（エリシペロスリクス）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ（フランシセラ）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ（リステリア）、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ（アクチノバチルス）、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ（ヘモフィルス）、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ（ヘリコバクター）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ（エロモナス）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ（ストレプトコッカス、連鎖球菌）、Ｓｈｉｇｅｌｌａ（赤痢菌）、Ｙｅｒｓｉｎｉａ（エルシニア）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（マイコバクテリウム）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ（マンヘミア）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（オルニソバクテリウム）、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ（リケッチア）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ（ウレアプラズマ）、およびＰａｓｔｅｕｒｅｌｌａ（パスツレラ）、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択される属から単離される、請求項１１に記載の細菌。

【請求項１３】

前記異種抗原をコードする核酸は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｇａｌｌｉｎａｒｕｍ（アビバクテリウム・パラガリナルム）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ａｖｉｕｍ（ボルデテラ・アビウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅａｌｅ（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ（腸炎菌）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ（パスツレラ・マルトシダ）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ（マンヘミア・ヘモリチカ、ヘモリチカ菌）、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ（クロストリジウム・パーフリンジェンス、ウェルシュ菌）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｇａｌａｃｔｉａｅ（マイコプラズマ・アガラクチアエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｋａｌｅｓｃｅｎｓ（マイコプラズマ・アルカレッセンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎａｔｉｓ（マイコプラズマ・アナティス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎｓｅｒｉｓ（マイコプラズマ・アンセリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｍｉｔａｎｓ（マイコプラズマ・イミタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｇｉｎｉｎｉ（マイコプラズマ・アルギニニ）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｐａｒｖｕｍ（ウレアプラズマ・パルハム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ（マイコプラズマ・アルスリチジス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ボビゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ボビリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｓ（マイコプラズマ・ボビス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ（マイコプラズマ・ボーボクリ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃｕｍ（マイコプラズマ・カリフォルニカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｒｉｃｏｌｕｍ（マイコプラズマ・カプリコルム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｄｉｓｐａｒ（マイコプラズマ・ディスパー）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・フェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ（マイコプラズマ・ファーメンタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｏｍｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ホミニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ハイオリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオシノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｏｗａｅ（マイコプラズマ・アイオワエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｌａｒｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ａｎｄ ｓｍａｌｌ ｃｏｌｏｎｙ（マイコプラズマ・ミコイデス ミコイデス大コロニー型および小コロニー型）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｒａｌｅ（マイコプラズマ・オラーレ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓ（マイコプラズマ・ペネトランス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｖｉｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・オビニューモニ

エ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｕｌｌｏｒｕｍ（マイコプラズマ・プローラム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｌｉｇａｔｏｒｕｓ（マイコプラズマ・アリガトラス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ニューモニエ、肺炎マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍａｌｅａｇｒｉｄｉｓ（マイコプラズマ・メレアグリディス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・ヘモフェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｍｉｎｕｔｕｍ（マイコプラズマ・ヘモマイニュータム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍａｔｏｐａｒｖｕｍ（マイコプラズマ・ヘマトパルハム）、またはこれらのいずれかの組み合わせに由来する、請求項１２に記載の細菌。

【請求項１４】

前記異種抗原をコードする核酸は、ニューカッスル病ウイルス、伝染性気管支炎ウイルス、トリニューモウイルス、鶏痘、伝染性ファブリキウス嚢病、伝染性喉頭気管炎ウイルス、トリインフルエンザ、アヒルウイルス性肝炎、アヒルウイルス性腸炎、ニワトリ貧血、マレック病ウイルスまたはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択されるウイルスから単離される、請求項１３に記載の細菌。

【請求項１５】

前記対象は脊椎動物である、請求項１に記載の細菌。

【請求項１６】

前記脊椎動物は、ヒト、ウシ亜科の動物、イヌ科の動物、ネコ科の動物、ヤギ亜科の動物、ヒツジ属の動物、ブタ類の動物、ラクダ科の動物、ウマ科の動物および鳥類を含む群から選択される、請求項１５に記載の細菌。

【請求項１７】

前記ウシ亜科の動物対象は雌ウシ、雄ウシ、バイソンまたはバッファローであり、前記イヌ科の動物対象はイヌであり、前記ネコ科の動物対象はネコであり、前記ヤギ亜科の動物対象はヤギであり、前記ヒツジ属の動物対象はヒツジであり、前記ブタ類の動物対象はブタであり、前記ラクダ科の動物対象はラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、ビクーナまたはグアナコであり、前記ウマ科の動物対象はウマ、ロバ、シマウマまたはラバである、請求項１５に記載の細菌。

【請求項１８】

前記鳥類対象は、いずれかの商業的にまたは家庭で飼育される鳥類である、請求項１５に記載の細菌。

【請求項１９】

前記鳥類は、ニワトリ（チャボを含む）、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、キジ、ウズラ、ヤマウズラ、ハト、ホロホロチョウ、ダチョウ、エミューまたはクジャクを含む群から選択される、請求項１８に記載の細菌。

【請求項２０】

細菌を弱毒化するための方法であって、前記方法は、少なくとも１つのＡＢＣトランスポーター遺伝子に変異導入することを含み、請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の弱毒細菌は対象の中で生き残る、方法。

【請求項２１】

対象における疾患の予防または寛解の方法であって、前記方法は、治療上有効用量のワクチン組成物または免疫原性組成物を前記対象に投与することを含み、前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌を含む、方法。

【請求項２２】

疾患の予防の方法であって、前記方法は、治療上有効用量のワクチン組成物または免疫原性組成物を、予防を必要とする対象に投与することを含み、前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌を含む、方法。

【請求項２３】

請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌を含む免疫原性組成物。

【請求項２４】

免疫原性上有効量の請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌と、薬理学的に許容できる担体とを含む、ワクチン組成物。

【請求項２５】

疾患の処置または予防のためのワクチン組成物の使用であって、前記ワクチン組成物は、請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌を含む、使用。

【請求項２６】

前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、水、生理食塩水、培養液、安定剤、炭水化物、タンパク質、タンパク質含有薬剤（ウシ血清もしくは脱脂粉乳など）および緩衝液またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択される少なくとも１つの薬学的に許容できる担体または希釈剤をさらに含む、請求項２３に記載の免疫原性組成物または請求項２４に記載のワクチン組成物。

【請求項２７】

前記安定剤はＳＰＧＡであってもよい、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項２８】

前記炭水化物は、ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、グルコース、デキストランまたはこれらの組み合わせを含む群から選択される、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項２９】

前記タンパク質はアルブミンまたはカゼインである、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項３０】

前記タンパク質含有薬剤はウシ血清または脱脂粉乳である、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項３１】

前記緩衝液は、マレイン酸塩、リン酸塩、ＣＡＢＳ、ピペリジン、グリシン、クエン酸塩、リンゴ酸塩、ギ酸塩、コハク酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、ピペラジン、ピリジン、カコジル酸塩、コハク酸塩、ＭＥＳ、ヒスチジン、ビス－トリス、リン酸塩、エタノールアミン、ＡＤＡ、炭酸塩、ＡＣＥＳ、ＰＩＰＥＳ、イミダゾール、ビス－トリスプロパン、ＢＥＳ、ＭＯＰＳ、ＨＥＰＥＳ、ＴＥＳ、ＭＯＰＳＯ、ＭＯＢＳ、ＤＩＰＳＯ、ＴＡＰＳＯ、ＴＥＡ、ピロリン酸塩、ＨＥＰＰＳＯ、ＰＯＰＳＯ、トリシン、ヒドラジン、グリシルグリシン、ＴＲＩＳ、ＥＰＰＳ、ビシン、ＨＥＰＢＳ、ＴＡＰＳ、ＡＭＰＤ、ＴＡＢＳ、ＡＭＰＳＯ、タウリン、ホウ酸塩、ＣＨＥＳ、グリシン、水酸化アンモニウム、ＣＡＰＳＯ、炭酸塩、メチルアミン、ピペラジン、ＣＡＰＳ、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択される、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項３２】

前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は凍結乾燥されているかまたはフリーズドライ状態にある、請求項２３から請求項３１のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項３３】

少なくとも１つのアジュバントをさらに含む、請求項２３から請求項３２のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項３４】

前記アジュバントは、フロインド完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、ビタミンＥ、非イオン性ブロックポリマー、ムラミルジペプチド、サポニン、鉱油、植物

油、カルボポール　水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、油乳剤サポニン、ビタミンＥ可溶化物またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択される、請求項３３に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項３５】

前記アジュバントはＥ．ｃｏｌｉ（大腸菌）易熱性毒素またはコレラ毒素である、請求項３３に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項３６】

前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、鼻腔内に、眼内に、皮内に、腹腔内に、静脈内に、皮下に、経口で、排泄腔に、エアロゾルによって（噴霧型ワクチン接種）または筋肉内に投与される、請求項２３から請求項３５のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項３７】

前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、羽弁投与または点眼剤投与によって投与される、請求項２３から請求項３６のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【請求項３８】

前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、１用量あたり少なくとも約10^{3}～約10^{5}弱毒細菌、または約10^{5}～約10^{7}弱毒細菌、または約10^{7}～約10^{9}弱毒細菌、または約10^{9}～約10^{11}弱毒細菌、または約10^{11}～約10^{13}弱毒細菌、または約10^{13}～約10^{15}弱毒細菌、または約10^{15}～約10^{17}弱毒細菌、または約10^{17}～約10^{19}、または少なくとも約10^{19}弱毒細菌を含む、請求項２３から請求項３７のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（関連出願の相互参照）

本願は、２００９年２月２０日出願のオーストラリア仮特許出願第２００９９００７３６号の利益を主張する。この仮特許出願は、参照によりその全体を本願明細書に援用したものとする。

【０００２】

本発明は、ワクチン組成物における使用のための、対象の中で生き残る生きた弱毒細菌の生産に関する。特に本発明は、対象の中で生き残りかつワクチン組成物の中で使用されうる弱毒細菌を生産するために、細菌の少なくとも１つのＡＢＣトランスポータータンパク質の機能を取り除くことに関する。

【背景技術】

【０００３】

細菌感染は、罹患率および死亡率に起因して動物産業において重大な経済的損失を引き起こし、しかもヒトの健康に対して重大な影響を及ぼす。特に、呼吸器感染症および敗血症は、動物またはヒト（対象）の群全体に広まって、それらの対象の健康に悪影響を及ぼしうる一般的な感染症である。これは、著しい生産性の低下、そして最終的にはその対象の死を生じる可能性がある。例えば病原菌、特にＭｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）属の病原菌は、呼吸器疾患の重大な原因である。敗血症は、典型的にはＥ．ｃｏｌｉ（大腸菌）によって引き起こされる。

【０００４】

細菌またはウイルスなどの弱毒病原微生物を含むワクチン組成物が、ワクチン接種を受けた動物およびヒトにおいて防御免疫応答を生成する上で有効であるということが知られている。このような弱毒生ワクチンは有利である。なぜなら、免疫化の後、そのワクチンの基礎になっている病原生物によるその後の抗原接種が、ワクチン接種によって最初に誘導される免疫応答の迅速な再刺激を生じるからである。これは、その病原体の増殖を阻害して、臨床的に関連する疾患の発症を防止するように機能する。

【０００５】
一般に、ワクチンにおける使用のための病原生物の弱毒化は、その生物がもはや病原性ではないように、１以上の病原性因子の完全または部分的な除去によって成し遂げられる。病原性因子は、疾患を直接引き起こし、かつ／または当該生物が宿主の中で生き残ることを許容する特質として一般に知られている。有害な宿主応答を促す特質も、病原性因子であるとして一般に知られている。典型的な病原性因子としては、例えば毒素、接着器官（ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ　ｏｒｇａｎｅｌｌｅ）および免疫回避機構が挙げられる。これは、多くの病原性因子が免疫を誘導することに関与し、そのため病原性因子の欠失があると、このようにして弱毒化された生物の免疫原性が損なわれるという点で、１つの問題を提示する。弱毒生ワクチンは、抗原性で、従って非病原性でありながらも十分なレベルの宿主免疫を誘導することができるまま留まることが好ましい。通常は、弱毒生ワクチンは、対象の中で生き残らず、これは、そのワクチンの基礎になっている生きた弱毒生物の免疫原性の低下に寄与する可能性がある。

【０００６】
毒素などのいくつかの病原性因子は弱毒化についての自明な標的である一方で、病原性因子として知られていない因子は弱毒化についての自明な標的ではない。生物の病原性に対するそれらの因子の弱毒化の効果は、容易に明らかにはならないし、また予測もできない。ＡＢＣ（ＡＴＰ結合カセット）トランスポータースーパーファミリーのメンバーは、通常は病原性因子とは考えられない。ＡＢＣトランスポーターは、細胞外膜および細胞内膜を越えて基質を移行させる機能を果たす膜タンパク質を含む。ＡＢＣトランスポーターによって輸送される物質としては、ペプチド、オリゴペプチド、タンパク質、代謝産物、脂質、ステロール、および薬物が挙げられる。ＡＢＣトランスポーターの配列比較から、このスーパーファミリーの遺伝子およびタンパク質は遠縁の門にわたって保存されているということが示される。

【０００７】
本発明は、病原生物の中のＡＢＣトランスポーター遺伝子の機能喪失型変異は、その病原生物を弱毒化したが、宿主－疾患モデル系で評価した場合、弱毒生物は免疫原性のまま留まり、その対象の中で生き残ったという、驚くべき知見に基づいている。

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００８】
第１の態様では、少なくとも１つのＡＢＣトランスポーター遺伝子の変異によって弱毒化された細菌であって、この変異は、対応するＡＢＣトランスポータータンパク質を非機能的にし、この弱毒細菌は対象の中で生き残る、細菌が提供される。

【０００９】
第２の態様では、細菌を弱毒化する方法であって、当該方法は、少なくとも１つのＡＢＣトランスポーター遺伝子に変異導入することを含み、この弱毒細菌は対象の中で生き残る、方法が提供される。

【００１０】
第３の態様では、第１の態様の少なくとも１つの弱毒細菌を含む免疫原性組成物が提供される。

【００１１】
第４の態様では、免疫原性上有効量の第１の態様の少なくとも１つの弱毒細菌と、薬理学的に許容できる担体とを含むワクチン組成物が提供される。

【００１２】
第５の態様では、疾患の処置または予防のためのワクチン組成物の使用であって、このワクチン組成物は第１の態様の少なくとも１つの弱毒細菌を含む、使用が提供される。

【００１３】
第６の態様では、対象における疾患の予防または寛解の方法であって、当該方法は、治療上有効用量のワクチン組成物または免疫原性組成物をこの対象に投与することを含み、

当該ワクチン組成物または免疫原性組成物は、第１の態様の少なくとも１つの弱毒細菌を含む、方法が提供される。

【００１４】

第７の態様では、疾患の予防の方法であって、当該方法は、治療上有効用量のワクチン組成物または免疫原性組成物を、予防を必要とする対象に投与することを含み、当該ワクチン組成物または免疫原性組成物は、第１の態様の少なくとも１つの弱毒細菌を含む、方法が提供される。

【００１５】

１つの実施形態では、変異は、挿入、欠失、置換またはこれらのいずれかの組み合わせによって生成されてもよい。この挿入変異は、例えば相同組み換え、トランスポゾン変異および配列タグ変異誘発によってもたらされてもよい。

【００１６】

１つの実施形態では、このＡＢＣトランスポーター遺伝子は、ＡＢＣペプチドトランスポータータンパク質をコードする遺伝子であってもよい。例えばＣｖａＢ、ＣｙｌＢ、ＳｐａＢ、ＮｉｓＴ、ＥｐｉＴ、ＣｏｍＡ、ＰｅｄＤ、ＬｃｎＣ、ＭｃｂＥＦ、ＯｐｐＤおよびＤｐｐＤ、およびこれらの相同体、特にＡＢＣトランスポーター遺伝子はＯｐｐＤをコードしてもよい。

【００１７】

１つの実施形態では、当該細菌は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ（アビバクテリウム）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（バチルス）、Ｂｒｕｃｅｌｌａ（ブルセラ）、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ（バルトネラ）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ（ボルデテラ）、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ（バークホルデリア）、Ｖｉｂｒｉｏ（ビブリオ）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（大腸菌類、エシェリキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（サルモネラ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ（クロストリジウム）、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ（カンピロバクター）、Ｃｈａｌｍｙｄｉａ（クラミジア）、Ｃｏｘｉｅｌｌａ（コクシエラ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ（エリシペロスリクス）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ（フランシセラ）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ（リステリア）、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ（アクチノバチルス）、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ（ヘモフィルス）、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ（ヘリコバクター）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ（エロモナス）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ（ストレプトコッカス、連鎖球菌）、Ｓｈｉｇｅｌｌａ（赤痢菌）、Ｙｅｒｓｉｎｉａ（エルシニア）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（マイコバクテリウム）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ（マンヘミア）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（オルニソバクテリウム）、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ（リケッチア）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ（ウレアプラズマ）、およびＰａｓｔｅｕｒｅｌｌａ（パスツレラ）を含む群から選択されてもよい。特にこの弱毒細菌は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｇａｌｌｉｎａｒｕｍ（アビバクテリウム・パラガリナルム）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ａｖｉｕｍ（ボルデテラ・アビウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅａｌｅ（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ（腸炎菌）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ（パスツレラ・マルトシダ）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ（ヘモリチカ菌）、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ（クロストリジウム・パーフリンジェンス、ウェルシュ菌）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｇａｌａｃｔｉａｅ（マイコプラズマ・アガラクチアエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎａｔｉｓ（マイコプラズマ・アナティス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎｓｅｒｉｓ（マイコプラズマ・アンセリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｍｉｔａｎｓ（マイコプラズマ・イミタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｋａｌｅｓｃｅｎｓ（マイコプラズマ・アルカレッセンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｇｉｎｉｎｉ（マイコプラズマ・アルギニニ）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｐａｒｖｕｍ（ウレアプラズマ・パルハム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ（マイコプラズマ・アルスリチジス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ボビゲニタリウ

ム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ボビリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｓ（マイコプラズマ・ボビス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ（マイコプラズマ・ボーボクリ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃｕｍ（マイコプラズマ・カリフォルニカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｒｉｃｏｌｕｍ（マイコプラズマ・カプリコルム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｄｉｓｐａｒ（マイコプラズマ・ディスパー）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・フェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ（マイコプラズマ・ファーメンタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｏｍｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ホミニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ハイオリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオシノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｏｗａｅ（マイコプラズマ・アイオワエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｌａｒｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ａｎｄ ｓｍａｌｌ ｃｏｌｏｎｙ（マイコプラズマ・ミコイデス ミコイデス大コロニー型および小コロニー型）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｒａｌｅ（マイコプラズマ・オラーレ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓ（マイコプラズマ・ペネトランス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｖｉｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・オビニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｕｌｌｏｒｕｍ（マイコプラズマ・プローラム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｌｉｇａｔｏｒｕｓ（マイコプラズマ・アリガトラス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ニューモニエ、肺炎マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍａｌｅａｇｒｉｄｉｓ（マイコプラズマ・メレアグリディス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・ヘモフェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｍｉｎｕｔｕｍ（マイコプラズマ・ヘモマイニュータム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍａｔｏｐａｒｖｕｍ（マイコプラズマ・ヘマトパルハム）であってもよい。

【００１８】

１つの実施形態では、この細菌は、トリ病原性大腸菌株Ｅ９５６、またはＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）株Ａｐ３ＡＳであってもよい。

【００１９】

１つの実施形態では、当該生きた弱毒細菌は異種抗原を発現してもよい。この異種抗原は、別の病原生物由来の核酸によってコードされてもよい。この異種抗原をコードする核酸は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ（アビバクテリウム）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（バチルス）、Ｂｒｕｃｅｌｌａ（ブルセラ）、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ（バルトネラ）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ（ボルデテラ）、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ（バークホルデリア）、Ｖｉｂｒｉｏ（ビブリオ）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（大腸菌類、エシェリキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（サルモネラ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ（クロストリジウム）、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ（カンピロバクター）、Ｃｈａｌｍｙｄｉａ（クラミジア）、Ｃｏｘｉｅｌｌａ（コクシエラ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ（エリシペロスリクス）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ（フランシセラ）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ（リステリア）、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ（アクチノバチルス）、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ（ヘモフィルス）、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ（ヘリコバクター）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ（エロモナス）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ（ストレプトコッカス、連鎖球菌）、Ｓｈｉｇｅｌｌａ（赤痢菌）、Ｙｅｒｓｉｎｉａ（エルシニア）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（マイコバクテリウム）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ（マンヘミア）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（オルニソバクテリウム）、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ（リケッチア）、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ

（ブドウ球菌）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ（ウレアプラズマ）、およびＰａｓｔｅｕｒｅｌｌａ（パスツレラ）を含む群から選択される属から単離されてもよい。特に、この異種抗原をコードする核酸は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｇａｌｌｉｎａｒｕｍ（アビバクテリウム・パラガリナルム）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ａｖｉｕｍ（ボルデテラ・アビウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅａｌｅ（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ（腸炎菌）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ（パスツレラ・マルトシダ）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ（マンヘミア・ヘモリチカ、ヘモリチカ菌）、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ（クロストリジウム・パーフリンジェンス、ウェルシュ菌）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）またはＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｇａｌｌｉｎａｒｕｍ（アビバクテリウム・パラガリナルム）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ａｖｉｕｍ（ボルデテラ・アビウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅａｌｅ（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｇａｌａｃｔｉａｅ（マイコプラズマ・アガラクチアエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｋａｌｅｓｃｅｎｓ（マイコプラズマ・アルカレッセンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎａｔｉｓ（マイコプラズマ・アナティス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎｓｅｒｉｓ（マイコプラズマ・アンセリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｍｉｔａｎｓ（マイコプラズマ・イミタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｇｉｎｉｎｉ（マイコプラズマ・アルギニニ）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｐａｒｖｕｍ（ウレアプラズマ・パルハム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ（マイコプラズマ・アルスリチジス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ボビゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ボビリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｓ（マイコプラズマ・ボビス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ（マイコプラズマ・ボーボクリ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃｕｍ（マイコプラズマ・カリフォルニカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｒｉｃｏｌｕｍ（マイコプラズマ・カプリコルム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｄｉｓｐａｒ（マイコプラズマ・ディスパー）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・フェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ（マイコプラズマ・ファーメンタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｏｍｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ホミニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ハイオリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオシノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｏｗａｅ（マイコプラズマ・アイオワエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｌａｒｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ａｎｄ ｓｍａｌｌ ｃｏｌｏｎｙ（マイコプラズマ・ミコイデス ミコイデス大コロニー型および小コロニー型）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｒａｌｅ（マイコプラズマ・オラーレ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓ（マイコプラズマ・ペネトランス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｖｉｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・オビニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｕｌｌｏｒｕｍ（マイコプラズマ・プローラム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｌｉｇａｔｏｒｕｓ（マイコプラズマ・アリガトラス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ニューモニエ、肺炎マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍａｌｅａｇｒｉｄｉｓ（マイコプラズマ・メレアグリディス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・ヘモフェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａ

ｅｍｏｍｉｎｕｔｕｍ（マイコプラズマ・ヘモマイニュータム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍａｔｏｐａｒｖｕｍ（マイコプラズマ・ヘマトパルハム）由来であってもよい。この異種抗原をコードする核酸は、ニューカッスル病ウイルス、伝染性気管支炎ウイルス、トリニューモウイルス、鶏痘、伝染性ファブリキウス嚢病、伝染性喉頭気管炎ウイルス、トリインフルエンザ、アヒルウイルス性肝炎、アヒルウイルス性腸炎、ニワトリ貧血（Ｃｈｉｃｋｅｎ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ａｎａｅｍｉａ）、マレック病ウイルスを含む群から選択されるウイルスから単離されてもよい。

【００２０】

対象は、ヒト、ウシ亜科の動物、イヌ科の動物、ネコ科の動物、ヤギ亜科の動物、ヒツジ属の動物、ブタ類の動物、ラクダ科の動物、ウマ科の動物および鳥類を含めた脊椎動物である。ウシ亜科の動物対象は、雌ウシ、雄ウシ、バイソンまたはバッファローであってもよい。イヌ科の動物対象は、イヌであってもよい。ネコ科の動物対象は、ネコであってもよい。ヤギ亜科の動物対象は、ヤギであってもよい。ヒツジ属の動物対象は、ヒツジであってもよい。ブタ類の動物対象は、ブタであってもよい。ラクダ科の動物対象は、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、ビクーナまたはグアナコであってもよい。ウマ科の動物対象は、ウマ、ロバ、シマウマまたはラバであってもよい。鳥類対象は、いずれの商業的にまたは家庭で飼育される鳥類であってもよい。特にこの鳥類は、ニワトリ（チャボを含む）、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、キジ、ウズラ、ヤマウズラ、ハト、ホロホロチョウ、ダチョウ、エミューまたはクジャクであってもよい。

【００２１】

当該ワクチン組成物および免疫原性組成物は、少なくとも１つの薬学的に許容できる担体または希釈剤（水、生理食塩水、培養液など）、安定剤、炭水化物、タンパク質、タンパク質含有薬剤（ウシ血清または脱脂粉乳など）および緩衝液またはこれらのいずれかの組み合わせをさらに含んでもよい。

【００２２】

安定剤はＳＰＧＡであってもよい。炭水化物としては、例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、グルコース、デキストランまたはこれらの組み合わせが挙げられる。加えて、アルブミンまたはカゼインなどのタンパク質またはウシ血清または脱脂粉乳などのタンパク質含有薬剤は、薬学的に許容できる担体または希釈剤として有用である可能性がある。

【００２３】

薬学的に許容できる担体または希釈剤として使用するための緩衝液としては、マレイン酸塩、リン酸塩、ＣＡＢＳ、ピペリジン、グリシン、クエン酸塩、リンゴ酸塩、ギ酸塩、コハク酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、ピペラジン、ピリジン、カコジル酸塩、コハク酸塩、ＭＥＳ、ヒスチジン、ビス－トリス、リン酸塩、エタノールアミン、ＡＤＡ、炭酸塩、ＡＣＥＳ、ＰＩＰＥＳ、イミダゾール、ビス－トリスプロパン、ＢＥＳ、ＭＯＰＳ、ＨＥＰＥＳ、ＴＥＳ、ＭＯＰＳＯ、ＭＯＢＳ、ＤＩＰＳＯ、ＴＡＰＳＯ、ＴＥＡ、ピロリン酸塩、ＨＥＰＰＳＯ、ＰＯＰＳＯ、トリシン、ヒドラジン、グリシルグリシン、ＴＲＩＳ、ＥＰＰＳ、ビシン、ＨＥＰＢＳ、ＴＡＰＳ、ＡＭＰＤ、ＴＡＢＳ、ＡＭＰＳＯ、タウリン、ホウ酸塩、ＣＨＥＳ、グリシン、水酸化アンモニウム、ＣＡＰＳＯ、炭酸塩、メチルアミン、ピペラジン、ＣＡＰＳ、またはこれらのいずれかの組み合わせが挙げられる。

【００２４】

当該ワクチン組成物および免疫原性組成物は、凍結乾燥されていてもよいし、またはフリーズドライ状態であってもよい。

【００２５】

いくつかの実施形態では、当該ワクチン組成物または免疫原性組成物は、少なくとも１つのアジュバントをさらに含んでもよい。アジュバントの例としては、フロインド完全アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバント、ビタミンＥ、非イオン性ブロックポリマー、ムラミルジペプチド、サポニン、鉱油、植物油、カルボポール（ｃａｒｂｏｐｏｌ）水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、油乳剤（例えばＢａ

ｙｏｌ　Ｆ（登録商標）もしくはＭａｒｃｏｌ　５２（登録商標））、サポニンもしくはビタミンＥ可溶化物（ｓｏｌｕｂｉｌｉｓａｔｅ）またはこれらのいずれかの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、当該ワクチン組成物は、粘膜への施用に特に有用なアジュバント、例えばＥ．ｃｏｌｉ（大腸菌）易熱性毒素またはコレラ毒素を含んでもよい。

【００２６】

当該ワクチン組成物または免疫原性組成物は、鼻腔内に、眼内に、皮内に、腹腔内に、静脈内に、皮下に、経口で、エアロゾルによって（噴霧型ワクチン接種）、排泄腔を介してまたは筋肉内に投与されてもよい。対象が鳥類である場合は、点眼剤およびエアロゾル投与が好ましい。エアロゾル投与は、当該ワクチン組成物または免疫原性組成物を非常に多くの対象に投与するのに特に好ましい。

【００２７】

当該免疫原性組成物またはワクチン組成物は、１用量あたり少なくとも約10^3～約10^5弱毒細菌、または約10^5～約10^7弱毒細菌、または約10^7～約10^9弱毒細菌、または約10^9～約10^{11}弱毒細菌、または約10^{11}～約10^{13}弱毒細菌、または約10^{13}～約10^{15}弱毒細菌、または約10^{15}～約10^{17}弱毒細菌、または約10^{17}～約10^{19}、または少なくとも約10^{19}弱毒細菌を含んでもよい。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１】構成要素および実験プロトコルの概略設計である。（Ａ）シグナチャータグ化トランスポゾンの基本構造。（Ｂ）シグナチャータグ化変異誘発法（ＳＴＭ）実験についての設計。

【図２】特異的タグの検出。色の変化を示したブロス培養液は、個々のシグナチャータグを検出するためのＰ２／Ｐ４プライマー対を使用するＰＣＲによってスクリーニングされた。各試料は、ＤＮＡサイズマーカー（ＨａｅＩＩＩを用いて消化されたｐＵＣ１８）と一緒に２％アガロースゲルの中で電気泳動にかけられた。レーン１、タグ０２を保有するＳＴ変異体；レーン２、タグ０３を保有するＳＴ変異体；レーン３、タグ０４を保有するＳＴ変異体；レーン４、タグ０６を保有するＳＴ変異体；レーン５、タグ０７を保有するＳＴ変異体；レーン６、陰性対照。レーン７、タグ０２を保有するトランスポゾンを鋳型として含有する陽性対照プラスミド。

【図３】ＳＴＭ形質転換体の確認。色の変化を示した形質転換体は、個々のシグナチャータグの存在を確認するために、Ｐ２／Ｐ４プライマーセットを使用するＰＣＲによってスクリーニングされた。各試料は、ＨａｅＩＩＩを用いて消化されたｐＵＣ１８というＤＮＡサイズ標品とともに、２％アガロースゲルの中で電気泳動にかけられた。レーン１、タグ０２を含有する組み換えＭｇ；レーン２、タグ０３形質転換体；レーン３、タグ０４クローン；レーン４、タグ０６形質転換体；レーン５、タグ０７を保有する形質転換体；＋、タグ０２プラスミドを鋳型として有する陽性対照。－、鋳型を加えていない陰性対照。

【図４】確認的スクリーニングの実験計画。

【図５】ＳＴ変異体の配列およびサザンブロット分析。（Ａ）直接配列決定によって得られた電気泳動図。（Ｉ）。単独のトランスポゾンを可読配列とともにゲノムに持ち込むＳＴ変異体２６－２。混合配列シグナルが、ＳＴ変異体１５－１（ＩＩ）および２５－１（ＩＩＩ）において、トランスポゾンおよび宿主株ゲノムの接合部から開始するのが見られる。（Ｂ）サザンブロッティングによって検出された複数の挿入。レーン１、ＳＴ変異体１５－１；レーン２、ＳＴ変異体１５－２；レーン３、ＳＴ変異体１５－３；レーン４、ＳＴ変異体２５－１；レーン５、ＳＴ変異体２５－２；レーン６、ＳＴ変異体２５－３。このＤＮＡサイズ標品は、ＨｉｎｄＩＩＩを用いて消化したファージλ　ＤＮＡであった。

【図６】病原性および感染力研究における、トリのＲＳＡスコアおよび気嚢病変スコアの分布。（Ａ）感染後２週間におけるＲＳＡスコア。（Ｂ）気嚢病変スコア。グループ１、陰性対照；グループ２、ＳＴ変異体０４－１に感染；グループ３、ＳＴ変異体３３－１に

感染；グループ４、ＳＴ変異体０３－１に感染；グループ５、ＳＴ変異体２６－１に感染；グループ６、ＳＴ変異体１８－１に感染；グループ７、ＳＴ変異体２０－１に感染；グループ８、ＳＴ変異体２２－１に感染；グループ９、陽性対照（野生型Ａｐ３ＡＳに感染）。

【図７】トリのＲＳＡスコアおよび気嚢病変スコアの分布。（Ａ）２８日目におけるＲＳＡスコア。（Ｂ）気嚢病変スコア。６つの異なる気嚢の合計スコア。グループ１、陰性対照；グループ２、陽性対照（野生型Ａｐ３ＡＳに感染）；グループ３、ワクチン接種対照（ＳＴ変異体２６－１でワクチン接種を受けた）；グループ４、ワクチン接種を受け（ＳＴ変異体２６－１）かつ抗原接種した（野生型Ａｐ３ＡＳに感染）。

【図８】相同組み換えのために使用されたＰＣＲ構築物の概略図。ＰＣＲ産物は、上記のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて生成された。このカナマイシン遺伝子は、プライマー対ＴＸ／ＴＹを使用して、ｏｐｐＡおよびｄｐｐＤ遺伝子構築物の両方のために増幅された。構築物アームは、ｏｐｐＤについてはＷＳ／ＷＵおよびＷＹ／ＷＴを使用して、またはｄｐｐＤについてはＰＣＲにおいて６０量体プライマーＷＥ／ＷＦを使用することによる、さらなるＰＣＲ産物によって生成され加えられた。

【図９】ＰＣＲによる相同組み換えの検出。ｄｐｐＤ（パネルＡ）およびｏｐｐＤ（パネルＢ）遺伝子についてのオリゴヌクレオチドプライマーが、それぞれの領域をＥ．ｃｏｌｉ（大腸菌）株の中で増幅するための、ｏｐｐＤについてはプライマー対ＷＳ／ＷＴおよびｄｐｐＤについてはＴＺ／ＵＡを使用するＰＣＲにおいて使用された：Ｅ９５６（パネルＡおよびＢのレーン１）、ΔｄｐｐＤ（レーン１、パネルＡ）、およびΔｏｐｐＤ（レーン１、パネルＢ）。

【図１０】Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）Ｅ９５６　ｄｐｐＤおよびｏｐｐＤノックアウトのサザンブロット。カナマイシン、ｄｐｐＤおよびｏｐｐＤプローブは、放射標識され、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）Ｅ９５６、ΔｄｐｐＤ、およびΔｏｐｐＤ、それぞれレーン１、２、および３のＰｓｔ１で切断されたゲノムＤＮＡを探索するために使用された。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

（定義）

本願で使用する場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」および「その、当該、前記（ｔｈｅ）」は、文脈から明らかにそうではないとわかる場合を除いて、複数の言及対象を包含する。例えば、用語「１つのＡＢＣトランスポーター」は複数のＡＢＣトランスポーターをも包含する。

【００３０】

本願明細書に関しては、用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」は、「主要部分として包含するが、必ずしもそれのみを包含するわけではない」を意味する。さらには、語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」の派生語、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」などは、それに応じて変更された意味を有する。

【００３１】

本願明細書で使用する場合、用語「免疫原性上有効な」は、ワクチン接種の時または免疫原性組成物の投与の際に投与される生きた弱毒細菌の量が、対象において、細菌の病原型に対して効果的な免疫応答を誘導するのに十分であるということを意味する。

【００３２】

本願明細書で使用する場合、用語「処置すること」および「処置」は、状態もしくは症候を改善する、状態もしくは疾患の確立を防止する、または状態もしくは疾患もしくは他の望ましくない症候の進行を、どんなものであれ何らかの点で、別の態様で防止し、妨害し、遅延しもしくは逆戻りさせる、いずれかのおよびすべての使用を指す。

【００３３】

本願明細書で使用する場合、用語「生き残る」および「持続する、持続性の」は、対象の少なくとも一部分の感染またはコロニー形成の確立および／または維持を指す。持続性は、生物が、複製があろうとなかろうと、組織の中で生存する状態を包含する。「持続す

る、持続性の」は、臨床的に関連する疾患に関連する場合もあれば関連しない場合もある。

【００３４】

本発明は、対象の中で生き残る生きた弱毒細菌およびワクチン組成物におけるその使用に関する。この弱毒細菌は、ＡＢＣトランスポータータンパク質をコードする核酸における変異の結果として、少なくとも１つの機能的ＡＢＣトランスポータータンパク質を欠く。このＡＢＣトランスポータータンパク質は、いずれの手段によって非機能的とされてもよいが、典型的には、これはＡＢＣトランスポータータンパク質をコードする核酸の変異によって成し遂げられる。典型的には、この変異は、挿入、欠失またはフレームシフト変異またはこれらのいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形態では、この生きた弱毒細菌は異種抗原をも発現してもよい。

【００３５】

いずれの種類の細菌も本発明に従って弱毒化されてもよいが、脊椎動物の病原菌、特に鳥類の病原菌の弱毒化が好ましい。

【００３６】

（細菌）

１つの実施形態では、本発明は、ワクチン組成物における使用のための、属Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ（アクチノバチルス）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ（エロモナス）、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ（アビバクテリウム）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（バチルス）、Ｂｒｕｃｅｌｌａ（ブルセラ）、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ（バルトネラ）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ（ボルデテラ）、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ（バークホルデリア）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（大腸菌類、エシェリキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（サルモネラ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ（クロストリジウム）、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ（カンピロバクター）、Ｃｈａｌｍｙｄｉａ（クラミジア）、Ｃｏｘｉｅｌｌａ（コクシエラ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ（エリシペロスリクス）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ（フランシセラ）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ（リステリア）、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ（アクチノバチルス）、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ（ヘモフィルス）、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ（ヘリコバクター）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ（リステリア）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ（エロモナス）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ（パスツレラ）、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ（ストレプトコッカス、連鎖球菌）、Ｓｈｉｇｅｌｌａ（赤痢菌）、Ｙｅｒｓｉｎｉａ（エルシニア）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（マイコバクテリウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（オルニソバクテリウム）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ（マンヘミア）、Ｖｉｂｒｉｏ（ビブリオ）、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ（リケッチア）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ（ブドウ球菌）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ（ウレアプラズマ）、およびＰａｓｔｅｕｒｅｌｌａ（パスツレラ）（これらに限定されない）などの生きた弱毒細菌に関する。これらの細菌属は、鳥類および様々な異なる動物（ヒトを含む）の両方にとって病原性である非常に多くの種を含む。

【００３７】

特に、当該弱毒細菌は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｇａｌｌｉｎａｒｕｍ（アビバクテリウム・パラガリナルム）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ａｖｉｕｍ（ボルデテラ・アビウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅａｌｅ（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ（腸炎菌）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ（パスツレラ・マルトシダ）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ（マンヘミア・ヘモリチカ、ヘモリチカ菌）、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ（クロストリジウム・パーフリンジェンス、ウェルシュ菌）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｇａｌａｃｔｉａｅ（マイコプラズマ・アガラクチアエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌ

ｋａｌｅｓｃｅｎｓ（マイコプラズマ・アルカレッセンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎａｔｉｓ（マイコプラズマ・アナティス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎｓｅｒｉｓ（マイコプラズマ・アンセリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｍｉｔａｎｓ（マイコプラズマ・イミタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｇｉｎｉｎｉ（マイコプラズマ・アルギニニ）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｐａｒｖｕｍ（ウレアプラズマ・パルハム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ（マイコプラズマ・アルスリチジス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ボビゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ボビリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｓ（マイコプラズマ・ボビス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ（マイコプラズマ・ボーボクリ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃｕｍ（マイコプラズマ・カリフォルニカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｒｉｃｏｌｕｍ（マイコプラズマ・カプリコルム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｄｉｓｐａｒ（マイコプラズマ・ディスパー）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・フェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ（マイコプラズマ・ファーメンタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｏｍｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ホミニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ハイオリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオシノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｏｗａｅ（マイコプラズマ・アイオワエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｌａｒｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ａｎｄ ｓｍａｌｌ ｃｏｌｏｎｙ（マイコプラズマ・ミコイデス ミコイデス大コロニー型および小コロニー型）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｒａｌｅ（マイコプラズマ・オラーレ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓ（マイコプラズマ・ペネトランス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｖｉｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・オビニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｕｌｌｏｒｕｍ（マイコプラズマ・プローラム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｌｉｇａｔｏｒｕｓ（マイコプラズマ・アリガトラス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ニューモニエ、肺炎マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍａｌｅａｇｒｉｄｉｓ（マイコプラズマ・メレアグリディス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・ヘモフェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｍｉｎｕｔｕｍ（マイコプラズマ・ヘモマイニュータム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍａｔｏ ｐａｒｖｕｍ（マイコプラズマ・ヘマトパルハム）であってもよいが、これらに限定されない。

【００３８】

１つの実施形態では、当該生きた弱毒細菌は、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）またはＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）を含む群から選択されてもよい。

【００３９】

Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）は、トリ病原性大腸菌 Ｅ９５６であってもよく、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）はＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム） Ａｐ３ＡＳであってもよい。

【００４０】

（対象の中での持続性）

当該生きた弱毒細菌は対象の中で生き残る。この弱毒細菌の持続性は、好ましくは対象－疾患モデル系で評価されるが、本願明細書に記載されるワクチン組成物または免疫原性組成物が投与された対象の中で評価されてもよい。この弱毒細菌の持続性は、臨床徴候お

よび／または症候の観察を手段として評価されてもよい。あるいはまたは加えて、持続性は、対象から採取された試料の中の当該弱毒細菌の存在の判定によって評価されてもよい。この試料は、組織試料（例えば血液、皮膚、毛髪、頬側擦過）または身体の分泌もしくは排泄の試料、例えば粘液、尿、糞便、涙液であってもよい。試料は、対象が生きている間に、または剖検もしくは死検で採取されてもよい。その試料の中の弱毒細菌の存在は、培養、分子的方法（ＥＬＩＳＡもしくはＰＣＲなど）または当該技術分野で公知のいずれかの方法によって評価されてもよい。さらには、剖検または死検の時のその対象の侵された領域の観察は、当該弱毒細菌がその対象の中で生き残るかどうかの判定を可能にする可能性もある。

【００４１】

（ＡＢＣトランスポーター）

ＡＴＰ結合カセットトランスポーター（ＡＢＣトランスポーター）は、タンパク質および遺伝子の最大のスーパーファミリーのうちの１つを形成し、原核生物からヒトまでのすべての門において、代表的なＡＢＣトランスポーターが存在する。ＡＢＣトランスポーターは、ＡＴＰを利用して、細胞膜を越えて物質機能を輸送する膜貫通型タンパク質である。これらの物質としては、代謝産物ペプチド、オリゴペプチド、脂質およびステロール、および薬物が挙げられる。

【００４２】

細菌では、ＡＢＣトランスポーターは、各々が移し変える基質の種類に基づいて、３つの主な群にさらに分類される。これらのグループは、タンパク質トランスポーター、ペプチドトランスポーター、および非タンパク質基質を輸送する系である。

【００４３】

本発明によれば、生きた弱毒細菌は、当該細菌が少なくとも１つの機能的ＡＢＣトランスポータータンパク質を欠くように、これらのクラスのいずれかの少なくとも１つのＡＢＣトランスポーター遺伝子に変異導入することにより、生産されてもよい。

【００４４】

特に興味がもたれるものは、例えばＣｖａＢ（Ｅ ｃｏｌｉ（大腸菌））、ＣｙｌＢ（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ（エンテロコッカス・フェカリス、フェカリス菌））、ＳｐａＢ（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ（バチルス・スブチリス、枯草菌））、ＮｉｓＴ（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ（ラクトコッカス・ラクティス、ラクチス乳酸菌） ６Ｆ３）、ＥｐｉＴ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ（スタフィロコッカス・エピデルミデス、表皮ブドウ球菌））、ＣｏｍＡ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（ストレプトコッカス・ニューモニエ、肺炎連鎖球菌））、ＰｅｄＤ（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ ａｃｉｄｉｌａｃｔｉｃｉ（ペディオコッカス・アシディラクティシ））、ＬｃｎＣ（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ ｓｕｂｓｐ． ｌａｃｔｉｓ（ラクトコッカス・ラクティス ラクチス型））、ＭｃｂＥＦ（Ｅ ｃｏｌｉ（大腸菌）） ＯｐｐＤおよびＤｐｐＤ（Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）およびＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム））ならびに他の種の中のこれらの相同体を含むＡＢＣペプチドトランスポーターである。

【００４５】

（対象）

当該生きた弱毒細菌が投与されることになる対象は、ヒト、ウシ亜科の動物、イヌ科の動物、ネコ科の動物、ヤギ亜科の動物、ヒツジ属の動物、ブタ類の動物、ラクダ科の動物、ウマ科の動物および鳥類を含めたいずれの脊椎動物であってもよいということが企図される。ウシ亜科の動物対象は、雌ウシ、雄ウシ、バイソンまたはバッファローであってもよい。イヌ科の動物対象は、イヌであってもよい。ネコ科の動物対象は、ネコであってもよい。ヤギ亜科の動物対象は、ヤギであってもよい。ヒツジ属の動物対象は、ヒツジであってもよい。ブタ類の動物対象は、ブタであってもよい。ラクダ科の動物対象は、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、ビクーナまたはグアナコであってもよい。ウマ科の

動物対象は、ウマ、ロバ、シマウマまたはラバであってもよい。鳥類対象は、いずれの商業的にまたは家庭で飼育される鳥類であってもよい。特にこの鳥類は、ニワトリ（チャボを含む）、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、キジ、ウズラ、ヤマウズラ、ハト、ホロホロチョウ、ダチョウ、エミューまたはクジャクであってもよい。

【００４６】

（変異）

非機能的ＡＢＣトランスポータータンパク質を作り出すために利用される変異は、挿入、欠失もしくは置換変異またはこれらの組み合わせであってもよいが、ただしこの変異は、機能的ＡＢＣトランスポータータンパク質を発現できなくなることを導くものである。ＡＢＣトランスポータータンパク質は、複数の機能、例えばＡＴＰ結合またはオリゴペプチド結合を有してもよい。非機能的ＡＢＣトランスポータータンパク質としては、その機能のうちの少なくとも１つにおいて欠損があるＡＢＣトランスポータータンパク質が挙げられる。

【００４７】

このような変異は、挿入、欠失、置換変異またはこれらの組み合わせであることができるが、ただしこの変異は、機能的ＡＢＣトランスポータータンパク質を発現できなくなることを導くものである。好ましい実施形態では、この変異は、ＡＢＣトランスポータータンパク質をコードする核酸の少なくとも実質的な部分が削除されているノックアウト変異である。挿入変異は、例えば相同組み換え、トランスポゾン変異または配列タグ変異誘発によって作製されてもよい。

【００４８】

本発明に係る使用のための生きた弱毒細菌は、いくつかの方法で得てよい。例えば、生きた弱毒細菌は、突然変異誘発物質（プリンまたはピリミジン類似体など）、紫外光、電離放射線、ＤＮＡ挿入剤、温度処理、トランスポゾン変異を用いた野生型細菌の処理によって調製されてもよい。これらの方法は、特定の遺伝子に対する変異を標的とはせず、従って、病原性研究と組み合わせた標的遺伝子のＤＮＡ配列解析によるなどの当該技術分野で公知の方法による、弱毒化についての処理された細菌のスクリーニングを必要とする。

【００４９】

部位特異的な変異誘発などの公知の方法を使用する組み換えＤＮＡ技術が、特定の遺伝子、例えばｏｐｐＤの所定の部位で変異を導入するために使用されてもよい。変異遺伝子がもはや機能的ＡＢＣトランスポータータンパク質を発現しないように、１以上のヌクレオチドの挿入、欠失、置き換えなどの変異を導入するために部位特異的な変異誘発が使用されてもよい。このような変異は、例えばいくつかの核酸の欠失によって作製されてもよい。

【００５０】

わずか１つの塩基の欠失（つまりフレームシフトが作られる）で、ＡＢＣタンパク質を非機能的にすることができる。いくつかの実施形態では、非常に多くの塩基が削除される。他の実施形態では、ＡＢＣトランスポータータンパク質をコードする遺伝子の大多数またはすべてが削除されてもよい。終止コドンまたはフレームシフトを導入する変異は、非機能的ＡＢＣトランスポータータンパク質を得るのに適している。

【００５１】

ＡＢＣトランスポータータンパク質をコードする遺伝子は、コード配列を含むだけでなく、調節配列、例えばプロモーターをも含む。遺伝子は、正しいｍＲＮＡ翻訳のために必須の領域、例えばリボソーム結合部位をも含む。従って、当該生きた弱毒細菌は、コード領域にだけでなく、加えてまたはあるいは転写および翻訳のために必須の配列（プロモーターおよびリボソーム結合部位など）に変異を含んでもよい。

【００５２】

自然突然変異によって作り出される弱毒細菌とは対照的に、ＡＢＣトランスポーター遺伝子の断片を削除すること、もしくはＡＢＣトランスポーター遺伝子全体を削除すること、もしくは異種のＤＮＡ断片の挿入、またはこれらの組み合わせなどの変異によって作り

出される弱毒細菌は、それらが野生型病原菌に戻ることはないであろうという長所を有する。従って、好ましい実施形態では、本発明は、少なくとも１つのＡＢＣトランスポーター遺伝子が挿入および／または欠失を含む生きた弱毒細菌を提供する。

【００５３】

（異種抗原を発現する弱毒細菌）

１つの実施形態では、当該生きた弱毒細菌は、他の病原菌またはウイルスの抗原をコードする異種の遺伝子のための担体として使用されてもよい。これにより、生きた弱毒細菌が複数の疾患に対する免疫応答を誘発するために使用することができるようになる。

【００５４】

ＡＢＣトランスポータータンパク質をコードする遺伝子は、異種の遺伝子のための挿入部位として使用されてもよい。挿入物としてのＡＢＣトランスポーター遺伝子の使用は、異種抗原をコードする配列の挿入は、ＡＢＣトランスポータータンパク質を不活性化し、かつ１以上の異種抗原をコードする配列を導入するので、有利である。このような組み換え細菌の構築は、当該技術分野で公知の標準的な技術を使用して、ごく普通に行うことができる。

【００５５】

別の実施形態は、機能的ＡＢＣトランスポーターを生産せずかつ異種の核酸が挿入されている、属Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ（アビバクテリウム）、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ（スタフィロコッカス、ブドウ球菌）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（大腸菌類、エシェリキア）、Ｂｒｕｃｅｌｌａ（ブルセラ）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（サルモネラ）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ（ボルデテラ）、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ（バークホルデリア）、Ｖｉｂｒｉｏ（ビブリオ）、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ（ヘモフィルス）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（オルニソバクテリウム）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ（マンヘミア）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ（パスツレラ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ（クロストリジウム）、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ（カンピロバクター）、Ｃｈａｌｍｙｄｉａ（クラミジア）、Ｃｏｘｉｅｌｌａ（コクシエラ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ（エリシペロスリクス）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ（フランシセラ）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ（リステリア）、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ（アクチノバチルス）、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ（ヘモフィルス）、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ（ヘリコバクター）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ（エロモナス）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）、Ｓｈｉｇｅｌｌａ（赤痢菌）、Ｙｅｒｓｉｎｉａ（エルシニア）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（マイコバクテリウム）、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ（リケッチア）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ（ウレアプラズマ）、およびＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ（ストレプトコッカス、連鎖球菌）から選択される生きた弱毒組み換え細菌に関する。この異種の核酸は、別の病原性微生物またはウイルスから選択される抗原をコードしてもよい。この核酸は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｇａｌｌｉｎａｒｕｍ（アビバクテリウム・パラガリナルム）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ａｖｉｕｍ（ボルデテラ・アビウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅａｌｅ（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ（腸炎菌）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ（パスツレラ・マルトシダ）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ（マンヘミア・ヘモリチカ、ヘモリチカ菌）、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ（クロストリジウム・パーフリンジェンス、ウェルシュ菌）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）またはＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｇａｌａｃｔｉａｅ（マイコプラズマ・アガラクチアエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｋａｌｅｓｃｅｎｓ（マイコプラズマ・アルカレッセンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎａｔｉｓ（マイコプラズマ・アナティス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎｓｅｒｉｓ（マイコプラズマ・アンセリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｍｉｔａｎｓ（マイコプラズマ・イミタンス）、

Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｇｉｎｉｎｉ（マイコプラズマ・アルギニニ）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｐａｒｖｕｍ（ウレアプラズマ・パルハム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ（マイコプラズマ・アルスリチジス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ボビゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ボビリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｓ（マイコプラズマ・ボビス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ（マイコプラズマ・ボーボクリ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃｕｍ（マイコプラズマ・カリフォルニカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｒｉｃｏｌｕｍ（マイコプラズマ・カプリコルム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｄｉｓｐａｒ（マイコプラズマ・ディスパー）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・フェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ（マイコプラズマ・ファーメンタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｏｍｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ホミニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ハイオリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオシノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｏｗａｅ（マイコプラズマ・アイオワエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｌａｒｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ａｎｄ ｓｍａｌｌ ｃｏｌｏｎｙ（マイコプラズマ・ミコイデス ミコイデス大コロニー型および小コロニー型）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｒａｌｅ（マイコプラズマ・オラーレ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓ（マイコプラズマ・ペネトランス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｖｉ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・オビニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｕｌｌｏｒｕｍ（マイコプラズマ・プローラム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｌｉｇａｔｏｒｕｓ（マイコプラズマ・アリガトラス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ニューモニエ、肺炎マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍａｌｅａｇｒｉｄｉｓ（マイコプラズマ・メレアグリディス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・ヘモフェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｍｉｎｕｔｕｍ（マイコプラズマ・ヘモマイニュータム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍａｔｏｐａｒｖｕｍ（マイコプラズマ・ヘマトパルハム）を含む群から選択される病原生物由来の、またはニューカッスル病ウイルス、伝染性気管支炎ウイルス、トリニューモウイルス、鶏痘、伝染性ファブリキウス嚢病、伝染性喉頭気管炎ウイルス、トリインフルエンザ、アヒルウイルス性肝炎、アヒルウイルス性腸炎、ニワトリ貧血およびマレック病ウイルスなどの（これらに限定されない）ウイルス由来の抗原（１種または複数種）をコードしてもよい。

【００５６】

別の実施形態では、当該ＡＢＣトランスポーター遺伝子は、免疫応答を誘発または増強するように機能するタンパク質、例えばインターロイキンまたはインターフェロンをコードする核酸によって完全にまたは部分的に置き換えられてもよい。

【００５７】

（ワクチン組成物）

当該生きた弱毒細菌は、ワクチン組成物における使用に適している。このワクチン組成物は、対象の中で生き残ることができる生きた弱毒細菌の免疫原性上有効量と、薬学的に許容できる担体または希釈剤とを含んでもよい。本願明細書に記載されるワクチン組成物または免疫原性組成物は、鼻腔内に、眼内に、皮内に、腹腔内に、静脈内に、皮下に、経口で、排泄腔を介して、エアロゾルによって（噴霧型ワクチン接種）または筋肉内に投与されてもよい。特に、点眼剤およびエアロゾルによる投与は、対象が鳥類である場合に好ましい。エアロゾル投与は、当該ワクチン組成物または免疫原性組成物を非常に多くの対象に投与するときに、特に好ましい。

【００５８】

１つの形態では、本発明は、非弱毒形態ではＡＢＣトランスポーター遺伝子を含む細菌への感染に対する動物およびヒトの予防または処置のための弱毒生ワクチン組成物を提供

する。

【００５９】

この薬学的に許容できる担体または希釈剤は、水、生理食塩水、培養液、安定剤、炭水化物、タンパク質、タンパク質含有薬剤（ウシ血清または脱脂粉乳など）および緩衝液、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択されてもよい。

【００６０】

安定剤はＳＰＧＡであってもよい（１リットルあたり、ＳＰＧＡは、７４．６２ｇのスクロース、０．５２ｇのKH_2PO_4、１．２５ｇのK_2HPO_4、０．９１２ｇのグルタミン酸カリウムおよび１０ｇの血清アルブミンを含有する）。薬学的に許容できる担体または希釈剤として有用な炭水化物は、例えばソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、グルコース、デキストランまたはこれらの組み合わせである。加えて、タンパク質（アルブミンまたはカゼインなど）またはタンパク質含有薬剤（ウシ血清または脱脂粉乳など）は、薬学的に許容できる担体または希釈剤として有用である可能性がある。

【００６１】

薬学的に許容できる担体または希釈剤、リン酸緩衝液としての緩衝液は、マレイン酸塩、リン酸塩、ＣＡＢＳ（４－（シクロヘキシルアミノ）－１－ブタンスルホン酸）、ピペリジン、グリシン、クエン酸塩、グリシルグリシン、リンゴ酸塩、ギ酸塩、コハク酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、ピペラジン、ピリジン、カコジル酸塩、コハク酸塩、ＭＥＳ（２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸水和物　４－モルホリンエタンスルホン酸）、ヒスチジン、ビス－トリス（２，２－ビス（ヒドロキシメチル）－２，２’，２”－ニトリロトリエタノール）、リン酸塩、エタノールアミン、ＡＤＡ（Ｎ－（２－アセトアミド）イミノ二酢酸、Ｎ－（カルバモイルメチル）イミノ二酢酸）、炭酸塩、ＡＣＥＳ（Ｎ－（２－アセトアミド）－２－アミノエタンスルホン酸）、ＰＩＰＥＳ（１，４－ピペラジンジエタンスルホン酸）、イミダゾール、ビス－トリスプロパン（１，３－ビス［トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ］プロパン）、ＢＥＳ（Ｎ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）－２－アミノエタンスルホン酸）、ＭＯＰＳ（３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸）、ＨＥＰＥＳ（４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－エタンスルホン酸）、ＴＥＳ（２－［（２－ヒドロキシ－１，１－ビス（ヒドロキシメチル）エチル）アミノ］エタンスルホン酸）、ＭＯＰＳＯ（３－モルホリノ－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＭＯＢＳ（４－（Ｎ－モルホリノ）ブタンスルホン酸）、ＤＩＰＳＯ（３－（Ｎ，Ｎ－ビス［２－ヒドロキシエチル］アミノ）－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＴＡＰＳＯ（２－ヒドロキシ－３－［トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ］－１－プロパンスルホン酸）、ＴＥＡ（トリエタノールアミン）、ピロリン酸塩、ＨＥＰＰＳＯ（４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－（２－ヒドロキシプロパンスルホン酸）水和物）、ＰＯＰＳＯ（ピペラジン－１，４－ビス（２－ヒドロキシプロパンスルホン酸）脱水物）、トリシン、ヒドラジン、グリシルグリシン、ＴＲＩＳ（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）、ＥＰＰＳ（４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンプロパンスルホン酸）、ビシン、ＨＥＰＢＳ（Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（４－ブタンスルホン酸））、ＴＡＰＳ（［（２－ヒドロキシ－１，１－ビス（ヒドロキシメチル）エチル）アミノ］－１－プロパンスルホン酸）、ＡＭＰＤ（２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール）、ＴＡＢＳ（Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）メチル－４－アミノブタンスルホン酸）、ＡＭＰＳＯ（Ｎ－（１，１－ジメチル－２－ヒドロキシエチル）－３－アミノ－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸）、タウリン、ホウ酸塩、ＣＨＥＳ（２－（シクロヘキシルアミノ）エタンスルホン酸）、ＡＭＰ（２－アミノ－２－メチル－１－プロパノール）、グリシン、水酸化アンモニウム、ＣＡＰＳＯ（３－（シクロヘキシルアミノ）－２－ヒドロキシ－１－プロパンスルホン酸）、炭酸塩、メチルアミン、ピペラジン、ＣＡＰＳ（３－（シクロヘキシルアミノ）－１－プロパンスルホン酸）、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択されてもよい。

【００６２】

安定剤を添加すると、当該ワクチン組成物は、当該技術分野で公知の方法に従って凍結乾燥またはフリーズドライに適したものとなる。従って１つの実施形態では、当該ワクチン組成物は、フリーズドライ状態にあるかまたは凍結乾燥されている。

【００６３】

いくつかの実施形態では、当該ワクチン組成物はアジュバント活性を有する少なくとも１つの化合物を含んでもよい。ワクチン組成物での使用に適したアジュバントの例は、フロイント完全アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバント、ビタミンＥ、非イオン性ブロックポリマー、ムラミルジペプチド、サポニン、鉱油、植物油、カルボポール（ｃａｒｂｏｐｏｌ）水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、油乳剤（例えばＢａｙｏｌ　Ｆ（登録商標）もしくはＭａｒｃｏｌ　５２（登録商標））、サポニンもしくはビタミンＥ可溶化物またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択されてもよい。いくつかの実施形態では、当該ワクチン組成物は、粘膜への施用に特に有用なアジュバント、例えばＥ．ｃｏｌｉ（大腸菌）易熱性毒素またはコレラ毒素を含んでもよい。

【００６４】

本発明のワクチン組成物は、エアロゾル（噴霧型ワクチン）としての使用のために配合されてもよい。

【００６５】

本発明のワクチン組成物は、例えば点眼剤の形態で、眼への使用のために配合されてもよい。例えばこの点眼剤は、水性点眼剤、非水性点眼剤、懸濁液点眼剤または乳化点眼剤であってもよい。この点眼剤の製造は、この生きた弱毒細菌を、滅菌蒸留水、生理食塩水溶液などの水性溶媒中、または植物油（綿実油、大豆油、ゴマ油、落花生油が挙げられる）、鉱油などの非水性溶媒などの中に懸濁させることにより、行われる。等張化剤、ｐＨ調整剤、増粘剤、懸濁剤、乳化剤および防腐剤が、任意に添加されてもよい。

【００６６】

等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、ホウ酸、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、Ｄ－マンニトール、グルコースが挙げられる。ｐＨ調整剤としては、ホウ酸、無水亜硫酸ナトリウム、塩化水素酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸、酢酸カリウム、炭酸ナトリウム、ホウ砂が、および本願明細書に列挙される緩衝液のいずれかが挙げられる。増粘剤は、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ポリビニルピロリドンまたはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択されてもよい。

【００６７】

懸濁剤は、ポリソルベート８０、ポリオキシエチレン　硬化ヒマシ油６０、ポリオキシキャスターオイル（ｐｏｌｙｏｘｙ　ｃａｓｔｏｒ　ｏｉｌ）またはこれらの組み合わせを含む群から選択されてもよい。加えて、乳化剤の例としては、卵黄レシチンおよびポリソルベート８０が挙げられる。さらには塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、クロロブタノール、フェニルエチルアルコール、ｐ－ヒドロキシベンゾエートまたはこれらの組み合わせなどの防腐剤が使用されてもよい。

【００６８】

（投与量）

投与されるべき投与量は、典型的には、投与方法およびワクチン接種が求められる対象である病原体の種類に加えて、年齢、体重およびワクチン接種を受けるべき動物によって変わることになろう。

【００６９】

当該ワクチン組成物は、免疫応答を引き起こすのに十分ないずれの用量の細菌を含んでもよい。例えば、用量は、少なくとも10^3～約10^5弱毒細菌、または約10^5～約10^7弱毒細菌、または約10^7～約10^9弱毒細菌、または約10^9～約10^{11}弱毒細菌、または約10^{11}～約10^{13}弱毒細菌、または約10^{13}～約10^{15}弱毒細菌、または約10^{15}～約10^{17}弱毒細菌、または約10^{17}～約10^{19}、または少なく

とも約10^{19}弱毒細菌を含有してもよい。

【００７０】

１つの実施形態では、当該ワクチン組成物は、エアロゾルとして送達されてもよい。１立方メートルを処置するための用量は、少なくとも10^{6}～約10^{8}弱毒細菌または約10^{8}～約10^{10}弱毒細菌、または約10^{10}～約10^{12}、または約10^{12}～約10^{14}弱毒細菌、または約10^{16}～約10^{18}弱毒細菌、または約10^{8}～約10^{20}弱毒細菌、または少なくとも約10^{20}弱毒細菌を含みうる。

【００７１】

（投与方法）

本発明のワクチン組成物は、鼻腔内に、皮内に、排泄腔を介して、静脈内に、腹腔内に、皮下に、経口で、エアロゾルによって（噴霧型ワクチン接種）、飲料水の中に、餌の中にまたは筋肉内に投与されてもよい。家禽への施用のためには、エアロゾルによる投与および点眼剤による投与が好ましい。

【００７２】

噴霧型ワクチン接種は特に好ましい。なぜなら、この方法は、単に、ワクチン接種を受けるべき対象の存在下で当該ワクチン組成物のエアロゾルを噴霧または生成することによって、非常に多くの対象のワクチン接種を可能にするからである。ワクチン組成物を噴霧するとそのワクチン組成物（生きた弱毒細菌）のエアロゾルが生成され、このエアロゾルが動物によって吸入されると、当該生きた弱毒ウイルスはその動物へと送達され、気道を侵し、呼吸器疾患に似た症状を呈する。多大な時間を要する動物の個々の取り扱いが必要ではないので、このワクチン接種方法は特に効率的である。

【００７３】

これより本発明は、以下の具体例を参照してより詳細にさらに説明される。それらの具体例は、範囲を何ら限定するものではないと解釈されるべきである。

【実施例】

【００７４】

（実施例１：Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）変異体ライブラリーの作成および同定）

シグナチャータグ化変異誘発法（Ｓｉｇｎａｔｕｒｅ－ｔａｇｇｅｄ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ、ＳＴＭ）を使用して、Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）変異体ライブラリーを生成し同定した。ＳＴＭ戦略を図１に示す。ユニークなＤＮＡタグが、病原体を形質転換するために使用されるトランスポゾンの中へと組み込まれ、このゲノムの中でのシグナチャータグのランダム挿入が生じる。場合によっては、このシグナチャータグ（図１Ａ）は遺伝子の中へと組み込まれてその遺伝子を不活性化し、挿入変異をもたらす。次いで負の選択プロセスが使用され、適切な動物モデルの中でＳＴ変異体のプールがスクリーニングされる。入力側のプールおよび動物から回収されるＳＴ変異体は、個々のタグのＰＣＲ増幅、次いでハイブリダイゼーションを使用して比較される。この技術は、入力側（選択前）のプールの中に存在するが、動物対象の中での継代後に回収されるプールからは見つからない個々の変異体を同定する（図１Ｂ）。これらの見つからない変異体は、その対象の中でのコロニー形成および成長に関与する遺伝子の中に変異を含む可能性が最も高く、それゆえこれらの遺伝子は病原性に関連する決定因子をコードする可能性が高い。

【００７５】

（物質および方法）

菌種および培養条件

Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）（Ｍｇ）　Ａｐ３ＡＳは、もともと、オーストラリアでブロイラーの気嚢から単離されたものであり、非常に病原性が高い。これを、１０％ブタ血清を含有する改変Ｆｒｅｙ培地（ＭＢ）の中で、後期対数増殖期（ｐＨ　およそ６．８）まで、３７℃で成長させた。

【００７６】

シグナチャータグ化トランスポゾン

トランスポゾンＴｎ４００１ｍｏｄを保有するプラスミドｐＩＳＭ ２０６２．２を使用してＳＴ変異体ライブラリーを調製した。このトランスポゾンＴｎ４００１ｍｏｄは、ゲンタマイシン耐性遺伝子を含有していた。各シグナチャータグは、ユニークな４０ｂｐのオリゴヌクレオチドＤＮＡ配列（［ＮＫ］２０；Ｎ＝Ａ、Ｃ、ＧまたはＴ；Ｋ＝ＧまたはＴ）と、これに隣接する２０ｂｐの２つの不変アームからなっていた。この不変アームは、プライマー対Ｐ２／Ｐ４またはＰ３／Ｐ５を使用するＰＣＲによってこのユニークな領域の増幅および標識を可能にする。このシグナチャータグをｐＩＳＭ ２０６２．２のＫｐｎＩ制限酵素部位へとクローン化した（図１Ａ）。個々のシグナチャータグの配列を表１に列挙する。

【００７７】

【表１】

表 1 この研究で使用したシグナチャータグのDNA配列

タグ ID	オリジナル ID	DNA 配列 *	配列番号	サイズ (bp)	P2/P4#
タグ 01	Ptag5	CCACAGCGCTTTCTCCCGCGCCCAATCACCCACCCTCAAT	1	40	80
タグ 02	Ptag7	AGCTACAAGCGAACTACCTCCCGCTATCACCCGCTCGCA	2	39	79
タグ 03	Ptag9	ACCCATACCGAAACAACTCTCCCGCAAGCGCCCAACCCCT	3	40	80
タグ 04	Ptag10	ATCGAGGTATCGGTTGCTAGGGGGTACGCTAGGGGGAGTT	4	40	80
タグ 05	Ptag12	タグ 17 (R3-9) と同じ	5		
タグ 06	Ptag17	AGAGCTTGAAATATTGGGCGCGAGTGTTCAGGGTTGGGGT	6	40	80
タグ 07	Ptag20	AGATGAGGGGCTGGAGCTAGAGATGCTGATTTAGCGGAGG	7	40	80
タグ 08	1R1-5	タグ 04 (Ptag 10) と同じ	4		
タグ 09	1R1-10	ATCTATCCACCGATACTCCTCTCAATCTAGCGCGATACCT	8	40	80
タグ 10	1R1-20	GTCGTGCGTGGGAGAGGGCTATGGATGGTTGATGAGGGGT	9	40	80
タグ 11	1R1-29	CTATATCTACATCTCTCACCCGAGCGCTCCCCAAACCGCC	10	40	80
タグ 12	R2-3	CTCCACCTCTATCTCTCTATCCCCACATAGACCCACCTCC	11	40	80
タグ 13	R2-5	CCTATCACGCTTCCTCCTTCAACCTAACTCCCACTAGAGCT	12	41	81
タグ 14	R2-9	ATCTCCCTATCTCCCTCGAGCTCTTGCCCTCTAACAAGCT	13	40	80
タグ 15	R2-18	GTAATTCGTTCGGTATTTATTGGTCTGGCGGTAGGTAGTAG	14	41	81
タグ 16	R2-22	CTCCCTCTACTCCCCCGATACACACCCCTACCCACCAATCC	15	41	81
タグ 17	R3-9	CTGGGGGTGGAGAGGTCGGTGATTAGGAGTCTCGGTGTTA	5	40	80
タグ 18	R3-17	AAACCCCTGCCACGTCAGCGATCTCCCTCACACTAGCTCT	16	40	80
タグ 19	R3-23	CTCCCATTCCCACTCACCCGATCTTTGCCACTCCAAACCC	17	40	80
タグ 20	R3-24	ACTACGACATATCCTACACTACAACGCTACATCCCGCGCT	18	40	80
タグ 21	R3-33	GGAGATGTTCAAGTTAGGGAGGTGGCTGTAGGTAGAGAG	19	39	79
タグ 22	R3-35	AKCGGTATGTCGGTAGAGTGGTTGGGGTAGGAGGAGAGCG	20	40	80
タグ 23	R3-47	AGAGCGGGATAGTGTAGTTATCGTTAGGTCTTGTGGTTTTA	21	41	81
タグ 24	R3-50	AGAGATTTATCGATAGCGAGGTCGTGCTGGCGAGTGGGTG	22	40	80
タグ 25	R3-54	GTCGGGAGGGAGAAGATCAGTGTGTTG	23	27	67
タグ 26	R3-57	AGAGAAGTATCGGGATGTCGCTCGCGCTTGTGTGGGGGAA	24	40	80
タグ 27	R3-66	GTATGGGTAGGGGGAGAGGGAGCTAGTGATTTACAGGGAT	25	40	80
タグ 28	R23	GGCGGGGTGTAGAGAGATTGGGAGGGATGTACAGCGGGTT	26	40	80
タグ 29	R26	CGGGAGATAGAAGTTTTGAGAGGGAGAGTTAGATTGAGTG	27	40	80
タグ 30	R32	GGTGTGGGCGCTTAGTTGGGCAAGCTTGCGTGGTGGGTCT	28	40	80
タグ 31	R43	AGGTAGATATCTATAGAGGTAGTTAGGCTGGGGATCGAGGA	29	41	81
タグ 32	R46	CTCTATCCATCTCGTAACCCATATCGATAGATCGCAATAC	30	40	80
タグ 33	R52	CGATACAGACCCGAAATCTCTCAACCCCGCACGCAAACT	31	39	79
タグ 34	R56	ATCTAGCACCAACACTATCCATAGCCCACTATATATATTC	32	40	80
タグ 35	R62	GGGGGTAGAGCGTGAGCGGGATGTGTCGGGGGGTAGGGAG	33	40	80
タグ 36	R75	AAAGCTCTGGTGTCTGGGCGCTAGGGAGGGATCGAGGAGG	34	40	80
タグ 37	R77	CCCACACTCTCCGACCCCTCAGATCCCCCCCGCCAACCCT	35	40	80
タグ 38	R79	AGGGCGAGATGTAGGTGTATGGAGCTGGGGATGGAGATAA	36	40	80
タグ 39	R80	CCAACTCCTCCGTACACCCCCGCTAGCACCCCAATCCCTCG	37	41	81

* 不変アームを有しないユニークなオリゴヌクレオチドのDNA配列
# P2/P4プライマーセットを、シグナチャータグの不変アームから生成した。PCR増幅後の産物の予想されるサイズ (bp) を示す。

【００７８】

（シグナチャータグ化変異誘発法）

シグナチャータグによる形質転換

Ｍｇ　Ａｐ３ＡＳの希釈物を、１．５ｍｌのＭＢの中で一晩、３７℃で成長させた。色

の変化を示した希釈物を合わせ、室温で、１６，０００ｇで５分間の遠心分離によってその細胞をペレット化した。この細胞を、２００μｌの冷やしたＨＥＰＥＳ－スクロース緩衝液（８ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２７２ｍＭスクロース（ｐＨ　７．４））の中で再懸濁させた。この細胞を、室温で、１６，０００ｇで５分間の遠心分離によってペレット化し、冷やしたＨＥＰＥＳ－スクロース緩衝液でさらに２回洗浄し、次いで最後に４℃に冷やした４００μｌのＨＥＰＥＳ－スクロース緩衝液の中で再懸濁させた。

【００７９】

１００μｌのアリコートの細胞を氷の上に置き、１０μｇのプラスミドＤＮＡを加えた。次いでこの細胞－プラスミドＤＮＡ混合物を、氷上の冷やした０．２ｃｍギャップのキュベット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に移し、２．５ｋＶ、１００Ω抵抗および２５μＦキャパシタンスの設定値でＧｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ（商標）　（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して直ちに電気穿孔した。次いで、電気穿孔した細胞を１ｍｌの冷（４℃の）ＭＢの中に穏やかに再懸濁させ、室温で１０分間インキュベーションし、次いで、色の変化があるかどうかに応じて３７℃で２～３時間インキュベーションした。電気穿孔した培養液の５００μｌの試料を、ゆっくりと傾けることにより、１６０μｇ／ｍｌでゲンタマイシンを含有するＭＡプレート上に広げ、過剰分を、パスツールピペットを使用して取り除いた。次いでこのプレートを乾燥し、気密の広口瓶の中で、３７℃で７～１０日間インキュベーションした。

【００８０】

ＳＴ変異体の確認

プレート上で成長するＭｇコロニーを、パスツールピペットを使用して選択し、ゲンタマイシン（１６０μｇ／ｍｌ）を含有する１ｍｌのＭＢの中に置き、培地が色の変化を示すまでこの培養液をインキュベーションした。２００μｌの体積の培養液からの細胞を、微量遠心管の中で１６，０００ｇで５分間、室温で遠心分離することによりペレット化し、そのペレットを、もとの体積の１０分の１の蒸留水の中に再懸濁させた。次いでこの細胞を１００℃で５分間加熱し、ここからの２μｌをＰＣＲのための鋳型として使用した。ＳＴトランスポゾンの存在を確認するために、オリゴヌクレオチドプライマーＰ２およびＰ４（表２）を使用して、ユニークな配列を含有する不変アーム内の領域を増幅させた（図３）。このＰＣＲを２０μｌの反応液量の中で行った。これは２μｌの１０×反応緩衝液、１μＭの各プライマー、２００μＭの各ｄＮＴＰ、１．５ｍＭ　$MgCl_2$　１．５ＵのＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ）および２μｌの鋳型ＤＮＡを含んでいた。この反応を、９８℃で２分間の１サイクル、次いで、９４℃で３０秒間、５０℃で３０秒間および７２℃で４０秒間の３５サイクル、および最終の７２℃で７分間のインキュベーションを用いて、サーモサイクラー（Ｏｍｎｉｇｅｎｅ、Ｈｙｂａｉｄ）の中で行った。ＰＣＲ産物を、サイズ標品（ＨａｅＩＩＩで消化したｐＵＣ１８）とともに２％アガロースゲルの中で電気泳動にかけた。

【００８１】

【表２】

表 2 STM研究で使用したオリゴヌクレオチド

名称	用途	配列番号	5 -3' 配列 (bp単位でのサイズ)
P2	シグナチャータグ領域 PCR	38	ATCCTACAACCTCAAGCT (18)
P4	シグナチャータグ領域 PCR	39	ATCCCATTCTAACCAAGC (18)
IGstmGenmeF3	DNA 配列決定 ST 変異体 PCR	40	GGACTGTTATATGGCCTTTTTGGATC (26)
MG-F	Mg 16S 遺伝子 PCR	41	GTTGCAAATCCGTAAGGTGG (20)
MG-R	Mg 16S 遺伝子 PCR	42	TTAGCAACACGGTTTTAGAT (20)
EOGentSpeIRev	ゲンタマイシン遺伝子 PCR	43	actagtATCAGCCAATCGCTTAATTG (26)
EPGentSpeIFor	ゲンタマイシン遺伝子 PCR	44	actagtCTGAGTTTATGGAAGAAGTT (26)
M13-For	DNA 配列決定	45	GTTGTAAAACGACGGCCAGT (20)
M13-Rev	DNA 配列決定	46	CAGGAAACAGCTATGACC (18)
STM02-B-Rev	ST 変異体 PCR	47	TTCAATTCGAAAAATGAGTT (20)
STM03-B-Rev	ST 変異体 PCR	48	ACAGCTTGACGTTTTCCA (18)
STM04-B-1	ST 変異体 PCR	49	CGGGGACACAGTAAGGCTAA (20)
STM04-C-Rev	ST 変異体 PCR	50	CGCATTGATTCCTACCAC (18)
STM06-A-Rev	ST 変異体 PCR	51	AACATGGATTAGACGTTTGC (20)
STM09-B-Rev	ST 変異体 PCR	52	TGCCTTTCTTAATAGTGCTCA (21)
STM10-Rev	ST 変異体 PCR	53	TTGTGCCCATTCGTTAGT (18)
STM13-JA-rev	ST 変異体 13 配列決定	54	TTAATACGCCTGGGTAAGGTCG (22)
STM13-JB-for	ST 変異体 13 配列決定	55	TATCTATCACGTAATTGGAATGC (23)
STM13-KE	ST 変異体 13 配列決定	56	TCGCTATAACATTTGATTTAG (21)
STM13-KE-C'	ST 変異体 13 配列決定	57	CATTTTGATGTTTGCGTCA (19)
STM13-KE-C'-1	ST 変異体 13 配列決定	58	CTTCAAGTTCTCTGTGG (17)
STM13-KE-C'-1-Rev	野生型 Ap3AS PCR	59	CCACAGAGAACTTGAAG (17)

【表３】

STM13-KF	ST 変異体 13 配列決定	60	CCGTTTTTCTTTTATTCGTATTATC (25)
STM13-KF-C'	ST 変異体 13 配列決定 野生型 Ap3AS PCR	61	TATAAACCTGGTACGG (16)
STM13-KF-C'-1	ST 変異体 13 配列決定	62	CACACTGAAAGTTATATTA (19)
STM13-KF-C'-2	ST 変異体 13 配列決定	63	CTCACTATATAAAATAGC (18)
STM13-KG	ST 変異体 13 配列決定	64	CAGAAGATAAGTCTTTAACAG (21)
JX-STM17	ST 変異体 PCR	65	CTAGAAGAAGAAGAAGAGGTAACGAAGC (28)
STM18-Rev	ST 変異体 PCR	66	AGCAAAATTTCCACCCAAGA (20)
STM20-Rev	ST 変異体 PCR	67	GAGACATCAATCGCGGTTTT (20)
JZ-STM22	ST 変異体 PCR	68	CTCAATTGAAGAATTATATGATG (23)
STM23-B-Rev	ST 変異体 PCR	69	TTAACCCCATTCTTGCAG (18)
STM26-Rev	ST 変異体 PCR 野生型 Ap3AS PCR	70	CATCCCACCTGAAAACTCGT (20)
STM26-genome	野生型 Ap3AS PCR	71	GATCGGTGCACAGATTAAAG (20)
KB-STM33	ST 変異体 PCR	72	ACTACACGGTAGTTAGTAC (19)

小文字は、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を生成するためのヌクレオチド修飾を示す

【００８２】

（トランスポゾン挿入点の決定）

ＳＴ変異体からのＤＮＡの単離

各ＳＴ形質転換体を、１６０μｇのゲンタマイシン／ｍｌを補った４０ｍｌのＭＢの中で、３７℃で、後期対数増殖期（ｐＨ およそ６．８）まで成長させた。２０，０００ｇで３０分間の遠心分離によって細胞を回収し、冷やしたＰＢＳの中で２回洗浄し、ＳＤＳを加えて細胞を溶解し、次いでゲノムＤＮＡにせん断を加えるためにその溶液を２６ゲージ針に通した。ゲノムＤＮＡ抽出を、ＨｉｇｈＰｕｒｅ ＰＣＲキット（Ｒｏｃｈｅ）を用いて、わずかの変更を加えて製造業者の手順書に従って行った。最初のリゾチーム処理を省き、２００μｌではなく５０μｌの体積の１０ｍＭ Ｔｒｉｓ緩衝液（ｐＨ ８．０）の中でＤＮＡをカラムから溶出させた。既知の濃度の分子量標品（ＨｉｎｄＩＩＩで消化したファージλ ＤＮＡ）と一緒に０．７％アガロースゲルの中で１μｌの試料を電気泳動にかけることにより、精製したＤＮＡの量を推定した。

【００８３】

ゲノムＤＮＡの配列決定

ゲノムＤＮＡの配列決定のための手順を、Ｗａｄａ（２０００）から改変し変更した。Ｔｎ４００１に結合するプライマーＩＧｓｔｍＧｅｎｍｅＦ３（表２）を、トランスポゾン－ゲノムＤＮＡ接合部にわたって、およびＡｐ３ＡＳ ゲノムＤＮＡへと配列決定するために使用した。この配列を、ＡＢＩ ＰＲＩＳＭ Ｂｉｇ Ｄｙｅ ３．１ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒケミストリー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ）を使用して決定した。各反応液は、２～３μｇの精製したゲノムＤＮＡ、１０μＭのプライマーおよび４μｌのＢｉｇ Ｄｙｅ ３．１ 酵素混合物からなっており、サイクルシークエンス法を、９５℃で５分間の１サイクル、次いで９５℃で３０秒間、５５℃で３０秒間および６０℃で４分間の６０サイクルを使用してｉＣｙｃｌｅｒ（商標）（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）の中で行った。次いで製造業者の推奨手順に従って生成物を清浄にし、次いでＡＢＩ ３１００キャピラリーシークエンサーおよび関連ソフトウェア（Ａｐ

ｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ）を使用して分析した。各ＳＴトランスポゾンについての挿入部位を、ＢＬＡＳＴプログラム（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、ＮＣＢＩ）またはＦＡＳＴＡバージョン ３．３ｔ０７（ＰｅａｒｓｏｎおよびＬｉｐｍａｎ、１９８８）を使用して決定し、このＤＮＡ配列をＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）株Ｒｌｏｗゲノムのｄｎａ配列と比較した。

【００８４】

（Ｍｇ ＳＴ変異体の検出）

３７のシグナチャータグの各々に相補的なオリゴヌクレオチドを合成した。このオリゴヌクレオチドを、ＴＥ緩衝液の中に１００μＭの濃度まで再懸濁させた。１０μｌの体積の、各オリゴヌクレオチドの溶液（３ピコモルを含有する）を、Ｂｉｏ－Ｄｏｔ ＳＦ（登録商標） Ｍｉｃｒｏｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ Ａｐｐａｒａｔｕｓ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を製造業者の取扱説明書に従って使用してＨｙｂｏｎｄ－Ｎ＋ナイロン膜（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）上にスポッティングし、次いでこのオリゴヌクレオチドを３分間のＵＶ架橋によってその膜に固定した。各シグナチャータグに対応するＤＮＡプローブを、オリゴヌクレオチドプライマーＰ２およびＰ４をジゴキシゲニン（ＤＩＧ）（Ｒｏｃｈｅ）で、市販品を用いて標識したことを除いて、上記のＰＣＲ反応を使用して合成した。ＤＩＧ標識したプローブを、振盪する水浴の中で、ＤＩＧ Ｅａｓｙ Ｈｙｂ緩衝液（Ｒｏｃｈｅ）の中、４０℃で１６～１８時間、膜にハイブリダイズさせ、次いでその膜を、第２の洗浄を４５℃で行ったことを除いて製造業者の取扱説明書に従って洗浄した。結合したプローブを、ＤＩＧ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ）を使用して検出し、検出を、Ｂｉｏｍａｘフィルム（Ｋｏｄａｋ）を使用して記録した。ＰＣＲも行い、ゲンタマイシン耐性遺伝子の存在およびマイコプラズマ形質転換体の種を確認した。１．５ｍＭの$MgCl_2$、２００μＭの各ｄＮＴＰおよび１μＭの各プライマーを含有する２５μｌ反応混合物の中で１．５Ｕ Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼを使用して、各ＰＣＲ反応を行った。Ｍｇ １６Ｓ ｒＲＮＡ遺伝子の１つの領域を、９５℃で５分間、次いで９５℃で１０秒間、５８℃で１０秒間および７２℃で２５秒間の３５サイクルを通したインキュベーションによって増幅した。予想される生成物はサイズが２１９ｂｐであった。ゲンタマイシン耐性遺伝子の断片を、９５℃で２分間、次いで９５℃で３０秒間、６０℃で３０秒間および７２℃で１５秒間の２８サイクルを通してのインキュベーションによって、そして７２℃で５分間の最終のインキュベーションによって増幅した。生成物の予想されるサイズは２７８ｂｐであった。

【００８５】

ＤＩＧ検出システムを使用するシグナチャータグ間のクロスハイブリダイゼーション

ＤＩＧ標識したシグナチャータグのプールを、上記のとおりの３７のシグナチャータグオリゴヌクレオチドを含有する単一膜にハイブリダイズさせた。ＤＩＧ標識したタグは、このタグとプローブとの間のクロスハイブリダイゼーションがない限り、対応するユニークなオリゴヌクレオチドにのみ結合すると予想されるであろう。例えば、標識したタグ０２、０３および０４を含有するプールはドットブロット上のオリゴヌクレオチドタグ０２、０３ ０４にのみ結合すると予想され、いずれの他の陽性反応も交差反応とみなされるはずである。クロスハイブリダイゼーション反応は、標識したシグナチャータグの１３の異なるプールを使用して評価した。

【００８６】

（予備的な動物実験）

ＳＴ変異体の生細胞数の算出

１ｍｌあたりの色変化の単位（ＣＣＵ／ｍｌ）として測定した各ＳＴ変異体培養液の生菌数を、以下の手順を使用して決定した。滅菌した９６穴マイクロタイタープレート（Ｎｕｎｃｕｌｏｎ、Ｎｕｎｃ）の各ウェルに、ゲンタマイシン（１６０μｇ／ｍｌ）を含有する２２５μｌの滅菌したＭＢを加えた。８ウェルの第１の列に、２５μｌの変異体培養液を各ウェルに加え、ピペット操作により数回混合し、そして各ウェルからの２５μｌを

次の列に移し、新しい組のチップを使用して混合した。この一連の連続１０倍希釈を列１０まで繰り返し、この列１０から２５μｌを捨てた。列１１および１２を陰性対照として使用した。次いでこのプレートをＬｉｎｂｒｏ（登録商標）　プレートシール（ＩＣＮ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）で密封し、３７℃で最高２週間、インキュベーションした。培地のｐＨの大きな低下は培養液の成長を反映し、これは培地の中のフェノールレッド指示薬の赤色から黄色への色の変化によって示される。列１を１／１０希釈物とみなし、この培養液の最初の希釈についての補正の後に、ＣＣＵ／ｍｌの数字を、最確数表を使用して算出した。ニワトリの接種のために必要とされる各形質転換体の用量は1×10^{7}ＣＣＵ／ｍｌであった。

【００８７】

実験計画

１６羽の４週齢の特定病原体不在（ＳＰＦ）の白色レグホン（Ｗｈｉｔｅ　Ｌｅｇｈｏｒｎ）種のニワトリを、陽圧のファイバーグラスの隔離飼育器の中で収容した。１０のＳＴ変異体の一連の希釈物を、１６０μｇ／ｍｌのゲンタマイシンを含有するＭＢの中で、マイクロタイタープレートで一晩成長させた（表３）。各クローンの成長を翌日に評価し、対数期にあると見積もった希釈物から採取した１００μｌをプールに加えた。次いでプールしたＳＴ変異体をさらに１０倍ＭＢの中で希釈し、この希釈したプールを接種材料として使用した。１６羽のニワトリのうちの１２羽を、エアロゾルとしての投与によってこのプールしたＳＴ変異体に感染させた。残りの４羽のトリは接触感染対照としての役割を果たし、エアロゾル感染の３日後に隔離飼育器に入れた。エアロゾルに感染したトリのうちの６羽を、感染から１４日後に安楽死させて試料とし、残り（すべての接触感染のトリを含む）を、感染から２８日後に安楽死させて試料とした。

【００８８】

【表４】

表 3　試験したトランスポゾン

ST 変異体	挿入点までの遺伝子の%
02-1	(68.3)
03-1	(16.0)
04-1	(0.2)
06-1	54.6
09-1	60.3
17-1	80.1
19-1	88.6
32-1	52.0
35-1	76.4
37-1	20.5

【００８９】

試料の採取および分析

エアロゾル感染前および安楽死前にすべてのトリから血液試料を採取し、室温で３時間放置して凝固させた。次いで試料を室温で１０，０００ｇで５分間遠心分離することにより血清を回収し、次いでＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）に対する抗体反応を判定するためのＲＳＡ試験を使用して試験した。このＲＳＡ試験は、２５μｌの未希釈の血清および２５μｌの染色した市販のＭｇ　ＲＳＡ抗原（Ｉｎｔｅｒｖｅｔ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）をガラスプレート上で混合し、１分間揺り動かすことにより、行った。試験は、０（塊の生成なし）～４（抗原の大きい塊）の段階

を使用して採点した。各試験は、対照として陰性血清および陽性血清の両方を含んでいた。ニワトリを二酸化炭素吸入によって安楽死させた。肉眼的気嚢病変を調べ、重症度について以下のとおりの０～３の段階で採点した：

０＝病変なし、気嚢は薄い透明な膜

１＝気嚢に付着した乾酪性フィブリンの小さい斑点

２＝気嚢は濁ったように見え、かつ厚化し、中程度の量の乾酪性フィブリンが気嚢に付着している

３＝厚化した気嚢、および厚い乾酪性フィブリンで覆われた表面。

【００９０】

これらの定義の間に位置する病変については半スコアを与えた。左右の前胸気嚢、左右の後胸気嚢および左右の腹気嚢についてスコアを記録した。６つのスコアの合計を、各々個々のトリについての最終スコアとして使用した。拭き取り検体を各トリの気嚢、気管、肺、脾臓、肝臓、腎臓および脳から採取した。この拭き取り検体を使用して、１６０μｇゲンタマイシン／ｍｌを含有するＭＡプレートおよびゲンタマイシンを含まないＭＡプレートに接種し、次いで１６０μｇ／ｍｌのゲンタマイシンを補った３ｍｌのＭＢの中へと入れた。ＭＡプレートを、３７℃でインキュベーションし、７～１０日後に双眼実体顕微鏡（ｂｉｎｏｃｕｌａｒ　ｄｉｓｓｅｃｔｉｎｇ　ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅ）を使用して調べた。これまでの研究では、接種から１４日後のインビボ実験の間に、いくつかの変異体からのＴｎ４００１トランスポゾンの喪失を検出した。これらの変異体は野生型の表現型を取り戻したが、ゲンタマイシンの選択圧の下では生存することができなかった。ゲンタマイシンを含有しないプレート上のコロニーの数がゲンタマイシンを含有するプレート上のコロニーの数の１０倍以上であるとき、トランスポゾンの喪失が疑われた。ＭＢ培養液を３７℃でインキュベーションし、色の変化を示したブロスからＤＮＡを抽出し、このＤＮＡを上記のとおりのＰＣＲにおける鋳型として使用し、Ｐ２／Ｐ４プライマー対を使用してユニークなタグ領域を増幅した。

【００９１】

（結果）

ＳＴ変異体の確認

Ｐ２／Ｐ４プライマー対を使用してシグナチャータグから生成されたＰＣＲ産物の予想したサイズは、タグ２５からのサイズ（これは６７ｂｐであった）を除いて、７９～８１ｂｐの間であった。シグナチャータグを含有する各プラスミドをＭｇ株Ａｐ３ＡＳに導入し、形質転換体を無作為に選択し、ゲンタマイシンを補った培地の中で成長させた。成長を示したすべてのＭＢ培養液をＰＣＲにかけ、ユニークなシグナチャータグを含有するＳＴ変異体（図２）の存在を検出した。ＳＴ変異体ライブラリーを、各シグナチャータグから生成した少なくとも９の形質転換体を用いて確立し、さらなる実験のために使用した。

【００９２】

トランスポゾン挿入部位の決定

この章に記載する研究で使用した１０のＭｇ　ＳＴクローンの各々についてのトランスポゾン挿入部位を、ゲノムＤＮＡを直接配列決定することによって決定した（表３）。このトランスポゾンは、５つのＳＴ変異体において、ユニークな仮想タンパク質または保存された仮想タンパク質のいずれかをコードする領域に挿入した。

【００９３】

（ＳＴ変異体の最適化された検出）

シグナチャータグ間のクロスハイブリダイゼーション

ほとんどのタグは特異的であり、わずかにいくつかだけが他のタグに相補的なオリゴヌクレオチドとクロスハイブリダイゼーションした。タグ０２と３７との間の強い交差反応があった（プールＡ、Ｅ、ＧおよびＨにおいて）。いくつかのクロスハイブリダイゼーションもタグ１５と３０との間で検出した（プールＤ、ＩおよびＪにおいて）が、プールＢに関してはクロスハイブリダイゼーションを検出しなかった。タグ１３（これがプールの中にあるとき）とタグ２８との間で一方向性のハイブリダイゼーションがあった。これは

、タグ２９と２３（プールＤおよびＨ）、およびタグ２９と２４（プールＤおよびＨ）に関しても、見られた。

【００９４】

（ＳＴ変異体によるニワトリの感染の予備的な評価）

気嚢の血清学的試験および肉眼的検査

抗Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）抗体応答を、感染の前後でＲＳＡ（表４）によって測定した。感染前には、トリではＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）特異的抗体を検出しなかった。エアロゾルによって感染したニワトリのうちで、３分の２が、感染後２週間の時に１より大きいＲＳＡスコアを有しており、そしてすべてが感染後４週間までに陽性となり、ＲＳＡスコアは１～４の間であった。接触感染対照のうちのただ１羽のみが１のＲＳＡスコアを有していた。軽度の気嚢病変（０．５のスコア）は感染後２週間の時に２／６のトリで見られ、感染後４週間の時に３／６のニワトリで見られ、一方で、１羽のトリは腹部気嚢に重篤な病変を有していた（２．５のスコア）。接触感染対照のうちのただ１羽のみが軽度の病変（０．５のスコア）を有していた。詳細な結果を表４に示す。

【００９５】

【表５】

表 4　予備的な実験においてトリの異なる部位から回収されたST変異体

時間	トリ	RSA	気嚢			気管		肺		心臓		脾臓		肝臓		腎臓		脳	
			病変	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB
2週目	744	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	745	1	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	746	1	0.5	-	37*	+	35, 37	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	747	0	0	-	-	-	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	748	0	0	-	-	+	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	751	0	0	-	-	-	32, 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4週目	741	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	742	1	0	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	35
	743	2	0.5	-	32	+	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	749	4	2.5	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
	750	1	0	-	-	+	35	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	757	2	1.0	-	37	+	37	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
接触感染対照(4週目)	737	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	738	0	0	-	混入	-	02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	739	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	740	1	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

RSA：急速血清凝集反応（Rapid serum agglutination）　　混入：混入があった培養物

* ハイブリダイゼーションによる検出したタグIDで、ゲンタマイシン遺伝子およびMg 16s rRNA遺伝子の存在についてPCRによって陽性

+: Mgコロニーが MA上で成長したか、またはMB中で色の変化が見られたことを示す

-：MAプレート上またはMB中で成長が見られなかった

【００９６】

回収したＳＴ変異体の復帰変異および同定

ＭＡプレートを、ゲンタマイシンの存在下および不存在下でのＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）の成長について調べた。インビボ継代後の、ＳＴ変異体からのトランスポゾンの喪失の証拠はなかった。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、接種から２週間後では１羽のトリの気嚢および２羽のトリの気管の拭き取り検体を接種したＭＡプレート上で、および感染後４週間では４羽のニワトリの気管の拭き取り検体を接種したＭＡプレート上で上でのみ単離し

た。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）を、感染から１４日後に１羽のトリの心臓から採取した拭き取り検体からも単離した。接触感染対照のどの器官の拭き取り検体からも、Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）を単離しなかった（表４）。感染後２週間に採取した気嚢の拭き取り検体の１つのブロス培養液および気管の４つのブロス培養液は色の変化を示し、１０のユニークなタグのうちの３つを、これらの試料からＤＩＧハイブリダイゼーションによって検出した。色の変化を示したブロス培養液は、感染から２８日の２羽のトリの気嚢の拭き取り検体および３羽のトリの気管の拭き取り検体から、ならびに５羽のトリの肺、４羽のトリの心臓、２羽のトリの肝臓、３羽のトリの腎臓、４羽のトリの脾臓および１羽のトリの脳を含めた他の器官の拭き取り検体からも得られた。色の変化を示したブロス培養液は、接触感染のトリのうちの１羽の気管、２羽の腎臓および２羽の脳の拭き取り検体からも得られた。しかしながら、２１日間のインキュベーション後の色の変化を示した培養液の中のゲンタマイシン耐性遺伝子およびＭｇ　１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子の存在を検出するために行ったＰＣＲはすべて陰性であった。これは、これらの培養液の中で観察した色の変化はＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）の成長から生じたものではないということを示唆した。タグ０２、３２、３５および３７を保有する変異体は、トリの気嚢、気管から、および１羽のトリの脳から忠実に回収され、最も一般的に検出したタグはタグ３２および３７であった（表４）。いくつかのブロス培養液はインキュベーション後７日以内に色の変化を示したが、タグはＤＩＧハイブリダイゼーションによって検出することができなかった（データは示さず）。

【００９７】

（実施例２：Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）ＳＴ変異体のインビボ分析）

（緒言）

ＳＴＭ技術は２つの主要な工程からなる：インビトロでのタグ化変異体ライブラリーの作成、次いで動物におけるインビボでの負の選択。上記の実施例１に記載した改変ハイブリダイゼーション検出システムを使用すると、入力側のプールは互いにクロスハイブリダイゼーションしないタグに由来する変異体のみを含有し、また検出のための明瞭なシグナルを与えた。実施例１のＳＴ変異体ライブラリーは、３７の異なるタグ化トランスポゾンを使用して生成した。この実施例は、感染したニワトリにおける負の選択を使用して、病原性に関与するかまたはインビボでの生存のために必要とされる遺伝子を同定するための３４の異なるタグを含有する１０２のＳＴ変異体のスクリーニングを記載する。

【００９８】

（物質および方法）

ＳＴ変異体の中の挿入部位の決定

各ＳＴ変異体由来のゲノムＤＮＡを、特異的プライマー（表２）を使用する直接配列決定にかけた。配列データを得ることができなかったか、またトランスポゾンの末端の後に混合配列決定信号を生成したＳＴ変異体については、サザンブロッティングを使用してトランスポゾン挿入の数を決定した。次いで複数のトランスポゾン挿入を有するＳＴ変異体は、トランスポゾン挿入点を同定しようとするさらなる試みには含めなかった。サザンブロッティング用のプローブを、タグ領域を増幅するためのＤＩＧ標識したプライマー（Ｐ２およびＰ４）を使用して調製した（表２）。ＳＴ変異体のゲノムＤＮＡを、２０Ｕの制限エンドヌクレアーゼ　ＢｇｌＩＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて、３７℃で一晩消化し、得られた断片を２．５Ｖ／ｃｍで０．７％アガロースゲルの中で一晩分離した。次いで、分離した断片をＨｙｂｏｎｄ　Ｎ＋ナイロン膜上に移し、ＤＩＧ標識したプローブにハイブリダイズさせ、ＤＩＧ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ）を製造業者の取扱説明書に従って使用してハイブリダイゼーションを検出し、ルミネセンスをＢｉｏｍａｘ　Ｆｉｌｍ（Ｋｏｄａｋ）上で記録した。

【００９９】

（感染したトリにおけるＳＴ変異体のスクリーニング）
ＳＴ変異体の調製
３つの接種材料（グループＡ、ＢおよびＣ）の各々についての３４のＳＴ変異体（この３４のＳＴ変異体の各々が別個のタグを含有する）の各々の１０倍希釈シリーズ（この３つの実験グループについて全部で１０２の変異体）を、ゲンタマイシン（１６０μｇ／ｍｌ）を補ったＭＢの中で、マイクロタイタープレートに作製し、３７℃で一晩インキュベーションした（表５）。適切な色の変化をもたらした各変異体の希釈物を接種のために使用した。各変異体の適切な培養液の０．１ｍｌ試料を取り、他の変異体の培養液と混合して、プールした接種材料を作成した。次いでこのプールしたＳＴ変異体を、ニワトリのエアロゾル接種のためにすぐに使用した。

【０１００】
【表６】

表 5　この研究で生成されたST 変異体の中のトランスポゾン挿入部位

(接種材料 A)

ST 変異体	ゲノムにおける挿入部位 (挿入点までの遺伝子の%)	破壊された遺伝子の機能
26-1	MGA_0220 (34.2)	ATP 結合タンパク質 OppD
26-2	MGA_0220 (34.2)	ATP 結合タンパク質 OppD
26-3	MGA_0220 (34.2)	ATP 結合タンパク質 OppD

【０１０１】
（初期スクリーニング）
実験計画
全部で９０羽の４週齢のＳＰＦのニワトリを無作為に３つのグループに割り振り、これらの各々を、陽圧のファイバーグラスの隔離飼育器の中で別々に収容した（１グループあたり３０羽のトリ）。各グループの２０羽のトリを、ＳＴ変異体のプールを用いてエアロゾルによって接種し、残りの１０羽のニワトリは、接触感染対照として働き、この１０羽のニワトリは、エアロゾルへの曝露から３日後に、接種したトリと一緒に置いた。接触感染対照は、ＳＴ変異体の伝染の能力を検討するために使用した。感染から１４日後に、１０羽の接種したニワトリから血液試料を集め、そしてこれらのニワトリを安楽死させ、病変を調べた。この血液試料を、Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）に対する抗体について、後述するような、ＲＳＡ試験を使用して試験した。すべてのトリを肉眼的気嚢病変について調べ、これらを、後述するような０～３の段階で重症度について評価した。各トリの気嚢および気管の拭き取り検体を培養し、後述するようにマイコプラズマを回収した。色を変えた各ブロス培養液からＤＮＡを抽出し、ユニークなタグ領域を増幅するためのＰＣＲにおける鋳型として使用した。次いでＰＣＲ産物を、後述するように、存在するＳＴ変異体を同定するためのサザンブロットで使用した。ＭＡプレートを、後述するように、１０日間のインキュベーション後にチェックした。接種から２８日後に同じ手順を使用して、残りのトリを安楽死させ、調べ、試料採取した。

【０１０２】
（確認的スクリーニング）
Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）ＳＴ変異体の調製
初期スクリーニング実験で再単離しなかったＳＴ変異体の希釈物を、１６０μｇゲンタマイシン／ｍｌを含有するＭＢの中で、３７℃で一晩成長させた。適切な程度の色の変化を引き起こした各ＳＴ変異体の希釈物を接種のために使用した。各変異体の培養液の０．１ｍｌ試料を他の変異体の試料と混合し、次いでこのプールを、新しいプールした接種材料として使用するためにＭＢ中で１０倍希釈し、これを、エアロゾルによってニワトリに接種するために使用した。

【０１０３】
実験計画
この確認的実験は、最終的な試験のための候補ＳＴ変異体の数を絞るために行った。実験計画および方法は、図４に示す初期スクリーニング実験と同様であった。全部で４０羽の４週齢のＳＰＦのニワトリを２つのグループに割り振った。初期スクリーニング実験では接種したトリの中で検出できなかったＳＴ変異体を、２つの接種材料（この各々を、トリの２つのグループのうちの１つにエアロゾルによって接種するために使用した）のうちの１つに割り振った。接触感染対照は、この実験には含めなかった。しかしながら、すべての４０羽のトリを同じ陽圧のファイバーグラスの隔離飼育器の中に入れたので、従って、各グループは他のグループに対する接触感染対照として使用することができた。これまでに記載したように同じ手順を使用して、接種から１４日後に試料採取を行った。手短に言えば、接種前および安楽死の直前に血液試料を集めた。気嚢および気管由来の拭き取り検体を、マイコプラズマの単離のために、死体解剖で集めた。すべてのトリを、肉眼的気嚢病変について調べた。ＲＳＡアッセイを使用して血清を試験した。色を変えた各ブロス培養液からＤＮＡを抽出し、ユニークなタグ領域を増幅するためのＰＣＲにおける鋳型として使用し、このあとこのユニークなタグ領域をドットブロットハイブリダイゼーションアッセイにおけるプローブとして使用した。これまでに記載したように、３７℃で１０日間のインキュベーション後にＭＡプレートをチェックした。ＭＡプレートからいくつかのコロニーを集め、ゲンタマイシンを補ったＭＢ中、３７℃で、色の変化が見られるまで培養した。ＤＮＡを抽出し、実施例１にこれまでに記載されたとおりに、Ｍｇ　１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子の２１９ｂｐの断片を増幅することによりマイコプラズマの種を確認するためのＰＣＲアッセイにおける鋳型として使用した（図４）。

【０１０４】
感染したトリから回収される特定のＳＴ変異体のＰＣＲ確認
配列決定結果（表２）に基づいて各ＳＴ変異体に特異的なＰＣＲプライマーを設計した。それらを、接種したトリ由来の培養液の中でＳＴ変異体の各々を検出するために、プライマーＩＧｓｔｍＧｅｎｍｅＦ３とともにＰＣＲアッセイで使用した。２μｌの鋳型としての抽出したＤＮＡ、２μｌの１０×反応緩衝液、１μＭの各プライマー、２００μＭの各ｄＮＴＰおよび１．５ＵのＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を含有する２０μｌの体積でＰＣＲを行った。ＰＣＲを、９５℃で２分間の１サイクル、次いで９４℃で４５秒間、５２℃で４５秒間および７２℃で１分間の３５サイクル、および最終の２℃で７分間のインキュベーションを用いて、サーモサイクラー（Ｏｍｎｉｇｅｎｅ、Ｈｙｂａｉｄ）の中で行った。

【０１０５】
（結果）
ＳＴ変異体における挿入点をマッピングすること
直接ゲノム配列決定技術を使用して、トランスポゾンの挿入部位を、９１のＳＴ変異体において決定した。１１の変異体については信頼できる配列データを得ることができなかった（表５）。ほとんどの場合、挿入部位はグループＡ、ＢおよびＣでは同じであったが、唯一の例外はＳＴ変異体０１－１、０２－２、０２－３、０４－３、０９－３および１７－３であった。

【０１０６】
直接配列決定できなかったＳＴ変異体をサザンブロッティングにかけ、トランスポゾン挿入の数を決定した。配列決定クロマトグラフは、トランスポゾンに対応する最初の１００ｂｐのデータは、質は良好であるということ、しかしトランスポゾンおよびゲノム配列の接合部に到達した後は混合シグナルが得られるということを示した（図５Ａ）。制限エンドヌクレアーゼＢｇｌＩＩがトランスポゾン配列内で切断することは予測していなかったので、プローブに結合されたバンドの数は、トランスポゾンが当該ＳＴ変異体のゲノム内に存在した回数を反映するはずである。複数のトランスポゾン挿入は、サザンブロッティングによってＳＴ変異体１５－１、１５－２、１５－３、２５－１、２５－２、２５－

３、３４－１、３４－２、３４－３、０９－３および１７－３で確認され、同じシグナチャータグを保有する変異体は、同一の挿入を有するようであった（表５および表６、図５Ｂ）。

【０１０７】

（初期スクリーニング実験）

病理学的および血清学的な知見

各実験グループからのＲＳＡ結果を表７に示す。いずれのトリ由来の血清においても、接種時には、抗マイコプラズマ抗体を検出しなかった。一般に、感染後２週間よりも４週間におけるほうがより多くの血清が陽性であり、どのグループにおいても接触感染のトリで抗体応答を検出しなかった。接種後４週間（グループＡ、ＢおよびＣにおいてそれぞれ０、１および２）よりも、２週間（グループＡ、ＢおよびＣにおいてそれぞれ２、２および４）におけるほうが、より多くのトリが気嚢病変を有していた。グループＣで１羽のニワトリが接種後４週間で３．０の病変スコアを有していたことを除いて、より重篤な気嚢病変は、接種から２週間後（グループＡにおいて０．５、グループＢにおいて１．０～２．０およびグループＣにおいて０．５～２．５のスコア）に観察された。より多くの気嚢病変がグループＣで見出された。病変の重症度は、ＲＳＡ結果とあまり相関しておらず、いくつかのトリは高いＲＳＡスコアを有していたが検出可能な気嚢病変は有していなかった。

【０１０８】

【表７】

表 6　この研究におけるST変異体の中のトランスポゾン挿入部位の分類

ST 変異体	トランスポゾン挿入部位	機能
26-1/-2/-3	MGA_0220	ATP結合タンパク質 OppD
09-3	複数の挿入	
13-1/-2/-3	マッチなし	
15-1/-2/-3	複数の挿入	
17-3	複数の挿入	
25-1/-2/-3	複数の挿入	
34-1/-2/-3	複数の挿入	

【０１０９】

【表８】

表７　初期スクリーニングでの各実験グループにおけるRSA結果、気嚢病変スコアおよび検出されたタグ

	RSA*				気嚢病変*			検出されたタグ(検出された回数)		
グループ	0週目	2週目	4週目	対照	2週目	4週目	対照	気嚢	気管	検出されず^
A#	0/30	7/10	8/9	0/8	2/10	0/9	0/8	16(1), 20(2), 28(2)	07(3), 11(1), 12(4), 14(1), 18(1), 19(2), 20(6), 21(1), 24(6), 26(1), 27(2), 28(2), 31(1), 32(1), 35(1), 38(1), 39(1)	02 (グループA, B), 03, 04, 06, 09, 10, 15, 17, 22, 23, 25, 33, 34
B	0/31	6/10	9/11	0/10	2/10	1/11	0/10	12(1), 20(1), 28(1)	07(1), 11(1), 12(3), 14(1), 16(1), 20(6), 27(1), 28(2),	
C#	0/29	5/10	9/10	0/7	4/10	2/10	0/7	02(1), 11(1), 12(1), 16(3), 18(1), 20(7), 27(1), 28(1)	01(1), 02(8), 11(1), 12(5), 13(1), 14(1), 16(3), 18(1), 20(10), 24(5), 27(6), 28(5), 36(1), 38(2)	

* 陽性の数/検査した数。完全なRSAおよび気嚢病変スコアデータは、付録Cに示す。
# 死体解剖前に、1羽の接種したトリおよび2羽の対照のトリがグループAで死に、2羽の接触感染のトリがグループCで死んだ。
^ 3つのグループの検出されなかったシグナチャータグの要約

【０１１０】
回収できるＳＴ変異体の同定
接種から１４日後および２８日後にトリから採取したブロス培養液の結果を表７に要約する。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）の回収のパターンは、予備的な実験で見られたパターンと類似であり、気嚢よりも気管からより多く単離された。一般に、感染後４週間よりも２週間においてより多くの単離がなされた。グループＢでは接触感染のトリからはＳＴ変異体は再単離されなかったが、グループＡでは５つの異なるＳＴ変異体を接触感染のトリから再単離し、グループＣでは接触感染のトリから２つの異なるＳＴ変異体を再単離した。タグ２０を保有するＳＴ変異体は、気嚢から、および気管から回収される最も一般的なものであり、すべての３グループにおいて高い検出率を有していた。次に最も一般的に単離した変異体は、タグ２８を保有する変異体であった。１２の異なるタグによって表される１６のＳＴ変異体は、再単離することができず、それらにはＳＴ変異体０２－１（－２）、０３－１（－２／－３）、０４－１（－２）、０４－３、０６－１（－２／－３）、０９－１（－２）、０９－３、１０－１（－２／－３）、１５－１（－２／－３）、１７－１（－２）、１７－３、２２－１（－２／－３）、２３－１（－２／－３）、２５－１（－２／－３）、３３－１（－２／－３）および３４－１（－２／－３）が含まれる。
【０１１１】
Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、いずれの接触感染のニワトリの気嚢または気管の拭き取り検体を用いて接種したＭＡプレート上でも単離されなかった。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、グループＡ、ＢおよびＣにおいてそれぞれ３羽、１羽および５羽のトリの気嚢から、接種から２週間後に採取した拭き取り検体を用いて接種したＭＡプレート上で単離された。それらは、グループＣでは５羽のニワトリの気管の拭き取り検体を用いて接種したＭＡプレート上でも単離されたが、グループＡまたはＢではいずれのトリからも単離されなかった。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、接種から４週間後に、グループＡ、ＢおよびＣにおいてそれぞれ、４羽、２羽および６羽のト

リの気嚢ならびに１羽、２羽および７羽のニワトリの気管から採取した拭き取り検体を用いて接種したＭＡプレート上で単離された。マイコプラズマが寒天培養液によって単離されたほとんどあらゆる場合には、それらはブロス培養液によっても単離された。トランスポゾンの喪失は、いずれのＳＴ変異体においても検出されなかった。

【０１１２】

（確認的スクリーニング実験）

初期スクリーニング実験で検出できなかった１６のＳＴ変異体を２つのグループに分けた。トランスポゾン挿入部位に関する配列データおよびサザンブロッティングは、ＳＴ変異体０４－１および０４－２の中のトランスポゾンは同じ挿入部位を有するが０４－３の挿入部位とは異なる挿入部位を有するということを示した。ＳＴ変異体０９－１および０９－２の中のトランスポゾン挿入部位は同一であるが、変異体０９－３は複数の挿入を有していた。同じ状況は、ＳＴ変異体１７－１、１７－２および１７－３においても見出された。これらの変異体のいずれも、初期スクリーニング実験では検出することができず、そのため、それらは、それらを見分けることができるように、２つの異なる接種材料の中へと入れた。グループ間で潜在的な伝染があり、これらの３つのシグナチャータグがドットブロットハイブリダイゼーションによって検出された場合は、ＰＣＲは、トリから再単離された変異体を同定するために使用することができた。

【０１１３】

病理学的および血清学的な評価

実験中にグループＡの１羽のトリが死亡し、グループＢの中の１羽が死亡した。グループＡにおいて、重篤な気嚢病変（２．５のスコア）が１羽のトリで見られ、軽度の病変（０．５および１．０）が別の２羽のニワトリにおいて見られた。グループＢでは１羽のトリが軽度の気嚢病変（１．０）を有していた。抗Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）抗体は、接種の前には検出されなかった．接種から２週間後に、グループＡのニワトリの１５／１９がＲＳＡ陽性であったのに対し、グループＢのトリの１４／１９が陽性であった。詳細な結果を表８に示す。

【０１１４】

【表９】

表 8　確認的スクリーニングでの各実験グループにおけるRSA結果、気嚢病変スコアおよび検出された変異体

グループ	RSA*		気嚢病変*	検出された変異体 (検出された回数)		
	0週目	2週目	2週目	気嚢	気管	検出されず^
A#	0/20	15/19	3/19	03-1(1), 09-1(1), 10-1(2), 15-1(1), 34-1(1)	02-2(4), 03-1(2), 04-3(1),06-1(1), 09-1(3),10-1(10), 15-1(1),17-2(12), 23-1(2), 25-1(1), 34-1(1)	04-1, 33-1
B#	0/20	14/19	1/19	09-3(2), 17-3(1), 23-1(2)	02-2(1), 03-1(1), 09-3(14), 10-1(5), 15-1(2), 17-3(10), 22-1(2), 23-1(15), 25-1(3), 34-1(2)	

* 陽性反応の数/検査した数。完全なRSAおよび気嚢病変データは、付録Dに示す。

グループAのトリは、ST変異体 02-2, 03-1, 04-1, 06-1, 09-1, 10-1, 15-1 および17-2を含有するプールで接種した；
グループBのトリは、ST変異体 04-3, 09-3, 17-3, 22-1, 23-1, 25-1, 33-1および34-1を含有するプールで接種した
死体解剖前に、グループAおよびBで1羽のトリが死んだ

^ 2つのグループの検出されなかったST変異体の要約

【０１１５】

ＳＴ変異体の再単離

Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、両方のグループにおいて、気嚢からよりも気管から採取した拭き取り検体を用いて接種したＭＡプレート上で、より一般に単離された。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、両方のグループにおいて、２羽のトリの気嚢の拭き取り検体を用いて接種したＭＡプレート上で単離され、そしてグループＢのニワトリの１８／１９の拭き取り検体から接種したＭＡプレート上で単離された。

【０１１６】

５つのＳＴ変異体をグループＡの３羽のニワトリの気嚢から回収し、３つのＳＴ変異体をグループＢの１羽のトリの気嚢から回収した。気嚢から採取した拭き取り検体よりも、気管から採取した拭き取り検体を用いて接種したＭＢにおいてより多くのＳＴ変異体を回収した。全部で１１のＳＴ変異体を、グループＡのニワトリから再単離し、グループＢの１８羽のトリから１０のＳＴ変異体を再単離した。

【０１１７】

再単離した最も一般的な変異体は、タグ２３を保有する変異体であった。この変異体は、１７羽のトリの気管から、および２羽のニワトリの気嚢から単離された。２番目に最も一般的に単離された変異体は１７－２であり、これらを１２羽のトリの気管から単離した（表８）。グループＡのトリを接種するために使用したＳＴ変異体０２－２、０３－１　１０－１および１５－１は、グループＢから再単離されたのに対し、グループＢのトリを接種するために使用したＳＴ変異体０４－３、２３－１　２５－１および３４－１は、グループＡから再単離された（表８）。ＳＴ変異体０４－１および３３－１は、いずれのグループのいずれのトリからも再単離することはできなかった（表８）。いずれのＳＴ変異体においてもトランスポゾンの喪失は検出されなかった。

【０１１８】

（実施例３：Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）の選択されたＳＴ変異体の感染力および病原性）

（ＳＴ変異体の調製）

初期スクリーニング実験でも確認的スクリーニング実験でも検出されたことがない２つのＳＴ変異体、０４－１および３３－１、ならびにまれに検出された５つ（ＳＴ変異体０３、１８、２０、２２および２６）を、１６０μｇ／ｍｌのゲンタマイシンを補ったＭＢ中、３７℃で後期対数増殖期まで培養した。野生型Ａｐ３ＡＳを、ゲンタマイシンを含有しないＭＢの中、３７℃で培養した。各株の濃度を、上記の方法を使用して、およそ１×１０^{7}ＣＣＵ／ｍｌに調整した。

【０１１９】

（病原性および感染力分析）

実験計画

８つのグループの４週齢のＳＰＦのニワトリを、陽圧のファイバーグラスの隔離飼育器の中に別々に収容した（１グループあたり２０羽のトリ）。６つのグループの各々を、異なるＳＴ変異体を用いてエアロゾルへの曝露によって接種した。陰性対照のトリをＭＢに曝露し、陽性対照のトリを野生型Ａｐ３ＡＳに曝露した。これらのトリを感染から１４日目に安楽死させ、上記のとおりに死体解剖検査を行った。血清および拭き取り検体を各トリから集め、ＭＡプレート上に接種し次いでゲンタマイシンを含まないＭＢの中に入れた、Ａｐ３ＡＳ感染グループから採取した拭き取り検体を例外として、抗マイコプラズマ抗体について検出およびマイコプラズマ単離を上記のとおりに行った。色の変化を示した各ブロス培養液からＤＮＡを単離して、これを、Ｐ２／Ｐ４プライマー対（表２）を使用してユニークなタグ領域を増幅するためのＰＣＲにおいて鋳型として使用した。ＰＣＲ産物を、これまでに上で記載されたとおり、特異的タグの存在を検出するためのドットブロットハイブリダイゼーションにおけるプローブとして使用した。また、接種したトリの中のＳＴ変異体（表２）を同定するための付加的なツールとしてＩＧｓｔｍＧｅｎｍｅＦ３プライマーおよび各ＳＴ変異体に特異的なプライマーを使用してＰＣＲを行った。気管の上

部、中央部および下部を各トリから採取し、組織病理学的に調べ、粘膜の厚さを測定した。

【０１２０】

再単離したＳＴ変異体の検出

ドットブロットハイブリダイゼーションおよびＰＣＲ増幅を使用して、ブロス培養液の中の各ＳＴ変異体を検出した。野生型Ａｐ３ＡＳはシグナチャータグを含有しないため、ドットブロットハイブリダイゼーションは、陽性対照グループからの培養液については使用することができなかった。ドットブロットハイブリダイゼーション技術は、上で詳述されている。手短に言えば、色の変化を示した培養液から抽出されたＤＮＡの中のタグ領域は、ＤＩＧ標識したプライマーセットを使用して増幅された。この実験で使用した変異体を同定する７つのシグナチャータグに対応するオリゴヌクレオチドをナイロン膜上にスポッティングし、その後、ハイブリダイゼーションで使用した。ＤＩＧ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ）を製造業者の取扱説明書に従って使用して、ハイブリダイゼーションを検出した。各変異体についての配列決定データを使用して、各ＳＴ変異体に特異的なＰＣＲプライマーを設計した。野生型株Ａｐ３ＡＳの再単離を確認するために使用したプライマー対（ＳＴＭ１３－ＫＥ－Ｃ’－１－ＲｅｖおよびＳＴＭ１３－ＫＦ－Ｃ’）は、ＳＴ変異体１３－１、１３－２および１３－３を配列決定したときに同定された領域を標的にしていた（表２）。

【０１２１】

２μｌの抽出したＤＮＡを鋳型として使用して、２μｌの１０×反応緩衝液、１μＭの各プライマー、２００μＭの各ｄＮＴＰおよび１．５Ｕのタｑ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を含有する２０μｌの反応液の中でＰＣＲ反応を行った。ＰＣＲを、９５℃で２分間インキュベーションし、次いで９４℃で４５秒間、５２℃で４５秒間および７２℃で１分間の３５サイクルでインキュベーションし、そして７２℃で７分間最終のインキュベーションを行った。

【０１２２】

（組織学的検討）

気管切片の調製

上部、中央部および下部の気管の試料を集め、固定のために、１０％の中性に緩衝化したホルマリン（１リットルあたり１０％ ホルマリン、４ｇ NaH_2PO_4および６．５ｇ Na_2HPO_4）に少なくとも２４時間浸漬した。次いで組織をパラフィンワックスの中へと処理し、次いで真空包埋した。厚さ２μｍの切片を切り出し、ガラススライドの上に採取した。脱ろうおよび再水和の後、この切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、病変についておよび粘膜の厚さの測定について光学顕微鏡法によって調べた。

【０１２３】

気管病変の検討および粘膜の厚さの測定

気管の上部、中央部および下部の切片における組織学的な病変を、重症度について以下のとおりの０～３の段階で採点した：

０＝目立った変化なし；

０．５＝リンパ球の非常に小さい凝集体（２未満の病巣）または非常にわずかの、散在性のリンパ球浸潤；

１＝リンパ球の小さい凝集体（２よりも多い病巣）またはリンパ球の散在性の浸潤によって引き起こされる粘膜のわずかの肥厚；

２＝偽好酸球およびリンパ球浸潤に起因する粘膜の中程度の肥厚、ならびに管腔の滲出に伴う、または管腔の滲出が伴わない上皮の変性に付随して起こる浮腫；

３＝偽好酸球およびリンパ球の浸潤によって引き起こされるかなりの肥厚、ならびに扁平上皮化生または上皮の変性および管腔の滲出を伴う浮腫。

【０１２４】

各トリの気管の粘膜の厚さを、各トリ由来の上部、中央部および下部の気管からの各切片上の６つの点で厚さを測定することにより決定した。次いでマイクロメートル単位での

平均の厚さを、この３つの領域の各々について算出した。

【０１２５】

統計解析

マンホイットニーのU検定（Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ　Ｕ　ｔｅｓｔ）（Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）用Ｍｉｎｉｔａｂ　バージョン１４．２）を使用して、各実験グループについての中央値組織学的気管病変スコアを比較した。スチューデントのｔ－検定（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔ）および一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）を使用して、平均の気管粘膜の厚さを比較した。確率（Ｐ値）≦０．０５を、有意であるとみなした。

【０１２６】

（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動）

ＳＴ変異体の各々ならびにＡｐ３ＡＳおよびｔｓ－１１株の対数増殖期中期（ｍｉｄ－ｌｏｇ　ｐｈａｓｅ）の培養液１ｍｌの試料の中の細胞を、１６，０００ｇで５分間の遠心分離によって集め、次いで１×ＳＤＳ－ＰＡＧＥ溶解緩衝液に再懸濁させ、１００℃で５分間インキュベーションし、その後に氷の上で急速冷却した。全細胞タンパク質を、１２．５％ポリアクリルアミドゲルの中で分子質量標品（Ｍａｒｋｅｒ　１２（商標）　Ｗｉｄｅ　Ｒａｎｇｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｔａｎｄａｒｄ、Ｎｏｖｅｘ）と一緒に分離し、次いでクーマシーブリリアントブルー（Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ　ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　ｂｌｕｅ）で染色した。

【０１２７】

（結果）

（ＳＴ変異体の病原性および感染力）

臨床徴候および死体解剖検査

気嚢病変は、ＳＴ変異体０４－１（グループ２）、３３－１（グループ３）または２２－１（グループ８）のエアロゾルに曝露されたトリでは、または陰性対照のトリ（グループ１）では、見られなかった。軽度の病変（０．２５のスコア）を、ＳＴ変異体０３－１（グループ４）で接種した１羽のトリで観察した。ＳＴ変異体２６－１（グループ５）に感染した２０羽のトリのうちで、４羽は軽度の病変（０．５０～１．００）を有していたのに対して、ＳＴ変異体１８－１（グループ６）に曝露された４羽のトリの腹部気嚢で病変を観察したのみであった。ＳＴ変異体２０－１に感染したグループ（グループ７）において２０羽のトリのうちの６羽が軽度～重篤な病変（０．５０～２．５０）を有していたのに対し、軽度～重篤な病変（０．５０～３．００）が、病原性のＡｐ３ＡＳ株（グループ９）に感染した１８羽のトリのうち１１羽で見られた。結果を表９に要約し、図６でグラフによって示す。

【０１２８】

【表１０】

表 9 病原性および感染力研究における、RSA結果、気嚢病変スコアおよびトリからの *M. gallisepticum*（マイコプラズマ・ガリセプチカム）の再単離率

グループ	接種材料	RSA* 2週目	気嚢病変*	MAプレート#		MB^	
				気嚢	気管	気嚢	気管
1	培地	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
2	ST 変異体 04-1	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
3	ST 変異体 33-1	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	2/20
4	ST 変異体 03-1	1/20	1/20	0/20	2/20	0/20	5/20
5	ST 変異体 26-1	0/20	4/20	1/20	6/20	1/20	10/20
6	ST 変異体 18-1	20/20	5/20	5/20	17/20	7/20	19/20
7	ST 変異体 20-1	20/20	6/20	7/20	20/20	8/20	20/20
8	ST 変異体 22-1	0/19	0/19	0/19	1/19	0/19	3/19
9	Ap3AS	18/18	11/18	9/18	18/18	10/18	15/18

* 結果を、陽性反応の数/検査した数として示す。完全なRSAおよび気嚢病変スコアデータは、付録Eに示す。死体解剖前に、1羽のトリがグループ8で死に、2羽のトリがグループ9で死んだ

結果を、陽性試料の数/集めた数として示す。

^ 結果を、色変化の試料の数/集めた数として示す。シグナチャータグは、グループ2～8でトリを感染させたST変異体によって保有されるシグナチャータグとして検出されただけであった

【０１２９】

ＳＴ変異体の抗体応答および再単離

感染の時に、抗マイコプラズマ抗体は、いずれの実験用のトリの血清においても、ＲＳＡ試験を使用して検出されなかった。感染から２週間後に、抗体応答は、グループ２、３、５および８のトリのいずれにおいても検出されなかったが、一方で応答は、グループ４の中で１羽のトリだけで検出可能であった。対照的に、Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）に対する強いＲＳＡ反応は、グループ６および７のすべてのトリで検出可能であった。陰性対照トリ（グループ１）は、ＲＳＡ試験においてＭｇに対する反応性を示さなかったが、一方ですべての陽性対照のトリ（グループ９）はＭｇに対して強いＲＳＡ反応を有していた（表９、図６）。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、グループ２（ＳＴ変異体０４－１に感染）またはグループ３（ＳＴ変異体３３－１に感染）のいずれのトリの気嚢または気管の拭き取り検体を用いて接種したＭＡプレート上では単離されなかった（表９）。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、グループ４（ＳＴ変異体０３－１に感染）または８（ＳＴ変異体２２－１に感染）のいずれのトリの気嚢の拭き取り検体を用いて接種したＭＡプレート上では単離されなかったが、それらは、グループ４の中の２羽のトリおよびグループ８の中の１羽のトリの気管から単離された。グループ５（ＳＴ変異体２６－１に感染）では、Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は１羽のトリの気嚢および６羽のトリの気管から単離された。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、グループ６（ＳＴ変異体１８－１に感染）の２０羽のトリのうちの１７羽およびグループ７（ＳＴ変異体２０－１に感染）のすべてのトリの気管からも単離され、グループ６の２０羽のトリのうちの５羽およびグループ７の２０羽のトリのうちの７羽の気嚢の拭き取り検体からも単離された。陽性対照グループ（グループ９）では、Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、１８羽のトリのうちの９羽の気嚢および１８羽のトリのうちの１７羽の気管から単離された。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、ＭＡプレート上よりもＭＢ中でインキュベーションした拭き取り検体

からより高頻度で単離された。Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）は、ＳＴ変異体０４－１（グループ２）に曝露されたいずれのトリの気嚢または気管の拭き取り検体で接種したＭＢの中では単離されなかった（表９）。他の変異体に感染したグループでは、Ｍｇは、グループ５（ＳＴ変異体２６－１）の１羽のトリ、グループ６（ＳＴ変異体１８－１）の７羽のトリおよびグループ７（ＳＴ変異体２０－１）の８羽のトリの気嚢の拭き取り検体で接種したＭＢにおいて回収された。Ｍｇは、ＳＴ変異体に曝露されたグループの６羽のトリの気管から回収され、感染したトリの数は、グループ３（ＳＴ変異体３３－１に感染）の２羽からグループ７（ＳＴ変異体２０－１に感染）の２０羽の範囲であった。回収されたＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）ＳＴ変異体の正体（ｉｄｅｎｔｉｔｙ）は、それらが保有するユニークなシグナチャータグを使用して確認した（表９）。

【０１３０】

気管病変および粘膜の厚さ

中央値気管病変スコア（ｍｅｄｉａｎ　ｔｒａｃｈｅａｌ　ｌｅｓｉｏｎ　ｓｃｏｒｅ）を表１０に示す。変異体に感染したグループすべてのトリのスコアは、陽性対照グループ（グループ９）のトリのスコアとは有意に異なっていた（Ｐ＜０．０００１）。陰性対照グループ（グループ１）とグループ５（ＳＴ変異体２６－１に感染）または７（ＳＴ変異体２０－１に感染）との間で有意差はなかった。ＳＴ変異体１８－１（グループ６）に感染したトリの下部気管病変スコアは、グループ２、３、４、５および７のトリの下部気管病変スコアとは異なっていなかったが、グループ８（ＳＴ変異体２２－１に感染）のトリおよび陰性対照グループ（グループ１）のトリの下部気管病変スコアとは有意に異なっており、その一方で陽性対照グループのトリの気管中央部における病変スコアだけが、他のグループのいずれのもののトリの病変スコアと異なっていた。平均の気管粘膜の厚さを表１０に示す。気管中央部の平均の粘膜の厚さは、変異体に感染グループ（グループ２～８）のいずれの間でも有意には異ならなかった。しかしながら、それらは、グループ２および７における平均の粘膜の厚さを除いて、陰性対照グループ（グループ１）の平均の粘膜の厚さよりも、すべて有意に大きく、しかもそれらは陽性対照グループ（グループ９）の平均の粘膜の厚さよりも有意に小さかった。上部および中央部の気管の粘膜の厚さにおいて陰性対照とグループ７（ＳＴ変異体２０－１に感染）との間に有意差はなかったが、下部気管においては差があった（Ｐ＝０．００４）。

【０１３１】

要約すれば、陽性対照は、組織学的な病変スコアまたは粘膜の厚さによって評価したところ、ＳＴ変異体に感染したグループのいずれよりも、有意により重篤な気管病変を有していた。グループ４（ＳＴ変異体０３－１に感染）は、ＳＴ変異体に感染したグループの中で、最も重篤に侵された。

【０１３２】

【表１１】

表 10 病原性および感染力研究における、トリの気管病変スコアおよび粘膜の厚さ

グループ	接種材料	中央値気管病変スコア（最小，最大）			平均の気管粘膜の厚さ±SD* (μm)		
		上部	中央部	下部	上部	中央部	下部
1	培地 (-)	0.25 (0, 0.5)[a]	0.25 (0, 0.5)[a]	0 (0, 0.25)[a]	50 ± 11 [a]	41 ± 8 [a]	37 ± 6 [a]
2	ST変異体 04-1	0.5 (0.25, 1.5)[b]	0.25 (0, 0.5)[b,c]	0.25 (0, 0.25)[a,b]	67 ± 11 [b]	53 ± 12 [a,b]	40 ± 9 [a,b,c]
3	ST変異体 33-1	0.75 (0.25, 3)[b]	0.25 (0, 2.5)[a,b]	0 (0, 0.25)[a,b]	73 ± 32 [b,c]	47 ± 13 [b]	38 ± 8 [b]
4	ST変異体 03-1	1 (0.25, 3)[b]	0.375 (0, 1.5)[c]	0.25 (0, 1.5)[c]	89 ± 45 [d]	54 ± 12 [b]	46 ± 22 [c]
5	ST変異体 26-1	0.5 (0, 2)[a,b]	0.25 (0, 1)[a,b]	0 (0, 2)[a,c]	64 ± 24 [b,e]	49 ± 14 [b]	48 ± 22 [b,c]
6	ST変異体 18-1	0.25 (0, 10)[a]	0.25 (0, 1.5)[a,b,c]	0.25 (0, 1.5)[b,c]	62 ± 15 [b,e]	53 ± 15 [b]	49 ± 15 [c,d]
7	ST変異体 20-1	0.25 (0, 1.5)[a]	0.125 (0, 1.5)[a]	0.125 (0, 1.0)[a,c]	56 ± 22 [a,c,e]	49 ± 23 [a,b]	51 ± 19 [c,d]
8	ST変異体 22-1	0.5 (0, 1)[a,b]	0.25 (0, 1)[a,b]	0 (0, 0.25)[a]	64 ± 13 [b,e]	49 ± 8 [b]	39 ± 8 [a,b]
9	Ap3AS (+)	1.5 (1, 3)[c]	1.50 (0.5, 3)[d]	1.50 (0.25, 3)[d]	168 ± 70 [f]	153 ± 84 [e]	120 ± 56 [e]

*SD：標準偏差
同じ上付き文字を伴う同じ列のデータは、有意には異ならない。
完全なデータは付録Fに示す。

【０１３３】

（実施例４：選択されたM．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ　ＳＴ変異体を用いたワクチン接種によってもたらされる防御の評価）

（ＳＴ変異体ワクチンの調製）

ＳＴ変異体２６－１を、１６０μｇゲンタマイシン／ｍｌを補ったＭＢ中、３７℃で成長させた。この培養液の中の生物の濃度を決定するために使用した方法は上記のとおりであった。ＳＴ変異体２６－１の濃度は、ワクチン接種についておよそ１×１０^{7}ＣＣＵ／１滴（２２．５μｌ）に調整し、次いで各トリに、この培養液の１滴によって眼内にワクチン接種した。

【０１３４】

（実験計画）

全部で８０羽の５週齢のＳＰＦのニワトリを無作為に４つのグループに割り当て、これらを陽圧のファイバーグラスの隔離飼育器の中に収容した。ＳＴ変異体２６－１は、０日目に点眼剤によって投与した。野生型Ａｐ３ＡＳは、免疫化の２週間後にトリを抗原接種するために、エアロゾルによって投与した。グループ１のトリは、陰性対照としての役割を果たした。これらのトリは、０日目に点眼剤によってＭＢでワクチン接種を受け、１４日目にエアロゾルによってＭＢで抗原接種された。グループ２のトリは、陽性対照としての役割を果たした。これらは、０日目に点眼剤によってＭＢでワクチン接種を受け、１４日目にエアロゾルによって野生型Ａｐ３ＡＳで感染された。グループ３のトリは、ワクチン接種対照としての役割を果たした。これらのトリは、０日目に点眼剤によってＳＴ変異体２６－１を投与された。次いでＭＢが、ワクチン接種から１４日後に、エアロゾルによって与えられた。グループ４のトリは、ワクチン接種を受けかつ抗原接種したグループとしての役割を果たした。ニワトリは、０日目に点眼剤によってＳＴ変異体２６－１で免疫化し、１４日目にエアロゾルによって野生型Ａｐ３ＡＳで抗原接種した。

【０１３５】

実験用のニワトリからの試料採取

ワクチン接種、抗原接種および安楽死の前に、すべてのニワトリから血液試料を集めた。次いで血清を回収し、抗マイコプラズマ抗体レベルの濃度を測定するためにＲＳＡによ

って試験した。免疫化の前、抗原接種時および死体解剖時に、各トリの体重も測定した。２８日目（抗原接種から１４日後）に、ニワトリを安楽死させ、死体解剖検査にかけ、Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）の培養のために試料を採取した。６つの気嚢を病変について目視により評価し、上記のとおり０～３で採点した。拭き取り検体をトリの気嚢および気管から採取し、ゲンタマイシンを加えていないＭＡ上に画線し、次いでＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）を単離するためにゲンタマイシンを含有しないＭＢの中へと移した。このＭＡプレートを３７℃で１０日間インキュベーションし、このＭＢ培養液を、色の変化が観察されるまで３７℃でインキュベーションした。色の変化を示したブロスからの生物を遠心分離によってペレット化し、ＳＴ変異体２６－１および野生型Ａｐ３ＡＳ（上記）を同定するためにＰＣＲ増幅にかけた。各トリの気管の上部、中央部および下部領域の試料を集め、１０％の中性に緩衝化されたホルマリンの中で少なくとも２４時間固定した。プロセシングおよび染色の後、光学顕微鏡法によって切片を調べた。病変を、上記のとおり、０～３の段階で重症度について採点した。各気管領域について６つの異なる点で粘膜の厚さを測定し、次いで平均厚さを、これら３つの領域の各々について算出した。

【０１３６】

Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）の再単離

ＳＴ変異体２６－１に特異的な一対のＰＣＲプライマー（ＩＧｓｔｍＧｅｎｍｅＦ３およびＳＴＭ２６－Ｒｅｖ）およびＰ２／Ｐ４プライマーセット（これはユニークなタグ領域を増幅する）を使用して、ＳＴ変異体２６－１の再単離を確認した。プライマー対ＳＴＭ２６－ｇｅｎｏｍｅおよびＳＴＭ２６－ＲｅｖはＳＴ変異体２６－１の中のトランスポゾン挿入部位のいずれかの側に結合し、これを野生型Ａｐ３ＡＳの再単離を確認するために使用した。このＰＣＲは、ＳＴ変異体２６－１をＡｐ３ＡＳ親株から容易に識別することができた（表２）。２μｌの１０×反応緩衝液、１μＭの各プライマー、２００μＭの各ｄＮＴＰおよび１．５ＵのＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を含有する２０μｌ反応液の中で、２μｌの抽出したＤＮＡを鋳型として用いて、ＰＣＲを行った。ＰＣＲを、９５℃で２分間インキュベーションし、次いで９４℃で４５秒間、５２℃で４５秒間および７２℃で１分間の３５サイクルを通してインキュベーションし、７２℃で７分間の最終のインキュベーションを行った。得られた産物を、ＤＮＡ分子量マーカーと一緒に、２％アガロースゲルの中で分離した。

【０１３７】

統計解析

各グループについての平均体重増加百分率を、一元配置ＡＮＯＶＡおよびスチューデントのｔ－検定（Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）用Ｍｉｎｉｔａｂｓ　ｖ１４．２）を使用して、差について解析した。中央値気管病変スコアを、マンホイットニーのＵ検定を使用して比較した。上部、中央部および下部の気管の平均の粘膜の厚さを、スチューデントのｔ－検定および一元配置ＡＮＯＶＡを使用して比較した。Ｐ値≦０．０５を有意であるとみなした。

【０１３８】

（結果）

（肉眼病変）

肉眼的気嚢病変は、陽性対照グループ（グループ２）のトリにおいてのみ見られた。このグループでは、５羽のトリが気嚢病変を有しており、全気嚢病変スコアは０．５～２．５の範囲であった。結果を表１０に要約し、図７にグラフによって示す。

【０１３９】

【表１２】

表 10 免疫防御研究におけるすべてのグループの、RSA試験、気嚢病変スコアおよび*M. gallisepticum*（マイコプラズマ・ガリセプチカム）の再単離の結果

グループ	ワクチン接種	抗原接種	RSA[#]		気嚢病変	MAプレート[^]		MB[&]			
			14日目	28日目		気嚢	気管	気嚢		気管	
								変異体 26-1	Ap3AS	変異体 26-1	Ap3AS
1	培地	培地	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
2	培地	Wt Ap3AS[*]	0/20	20/20	5/20	1/20	19/20	0/20	2/20	0/20	10/20
3	ST変異体 26-1	培地	0/20	16/20	0/20	1/20	2/20	1/20	0/20	2/20	0/20
4	ST変異体 26-1	Wt Ap3AS	0/20	20/20	0/20	0/20	7/20	0/20	0/20	0/20	9/20

[*] 野生型 Ap3AS
[#] 完全なRSAおよび気嚢病変スコアデータは、付録Gに示す。
[^] MAプレート上で成長する*M. gallisepticum*（マイコプラズマ・ガリセプチカム）のコロニーを示す試料の数/集めた試料の総数。
[&] ST変異体 26-1 および株Ap3ASの存在を判定するためにPCRを行った。

【０１４０】

（Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）の血清学的試験および再単離）

ワクチン接種および抗原接種時にトリから採取した血清は、検出可能な抗マイコプラズマ抗体を含有していなかった。陰性対照グループ（グループ１）のニワトリで、死体解剖時にＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）に対する何らかの検出可能な血清抗体を有していたものはなかった。対照的に、他の３つのグループの大部分のトリは、死体解剖時にＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）に対する検出可能な抗体を有していた。陽性対照グループ（グループ２）のすべてのトリは、Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）に対する中程度から強いＲＳＡ抗体応答を生成した。抗マイコプラズマ抗体を、グループ３からの２０の血清試料のうちの１６で検出し、ＲＳＡスコアは低い～中程度の範囲であった。グループ４（ＳＴ変異体２６－１でワクチン接種を受け、かつ野生型株に感染させた）のすべてのトリで、中程度の抗マイコプラズマ抗体価を検出した。結果を表１０に要約する。グループ２、３および４においては、Ｍ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）を、気嚢の拭き取り検体からよりも気管の拭き取り検体からより高頻度で単離し、そしてグループ１（陰性対照）のトリの気嚢または気管からはまったく単離されなかった。グループ２（抗原接種しただけ）および３（ワクチン接種を受けただけ）の各々１羽のトリにおいて気嚢の拭き取り検体からＭｇコロニーは成長したのに対して、再単離は、それぞれ１９羽および２羽のトリの気管から達成された。ワクチンとしてＳＴ変異体２６－１が与えられ、次いで株Ａｐ３ＡＳに感染させたグループ４では、Ｍｇは、１羽のトリの気嚢からの、および７羽のトリの気管からのＭＡプレート上で回収された（表１０）。これまでの実験でのように、再単離率は、ＭＡプレート上よりもＭＢ中でのほうが高かった。ＰＣＲ増幅から、グループ２および３から再単離した唯一のマイコプラズマは、そのグループに投与された株であったということが確認された。株特異的プライマー対を使用したＰＣＲ増幅後、グループ４から再単離した唯一のマイコプラズマは野生型Ａｐ３ＡＳであった。結果を表１０に示す。

【０１４１】

（ニワトリの体重増加）

ワクチン接種後１４日間にわたって、いずれのグループ間でも体重増加における有意差はなかった。４週目（抗原接種後１４日）で、陽性対照のトリ（グループ２）は、グループ１（陰性対照）または３（ワクチン接種対照）のトリよりも低い平均体重増加を有していたが（それぞれＰ＝０．００６および０．０２７）、グループ４（ワクチン接種を受け

、かつ抗原接種した）のトリよりは少なくはなかった（Ｐ＝０．３３２）（表１１）。抗原接種と死体解剖との間の期間（１４日目～２８日目）では、グループ２（抗原接種しただけ）のニワトリの平均体重増加は、他のグループの各々のトリの平均体重増加よりも有意に低かった。グループ３（ワクチン接種を受け、抗原接種していない）のトリの平均体重増加は、陰性対照の平均体重増加以下であったが、グループ４（ワクチン接種を受けかつ抗原接種した）のトリの平均体重増加よりも有意に大きかった（Ｐ＝０．０１６）。しかしながら、グループ４のトリの平均体重増加は、グループ１のトリの平均体重増加とは有意に異ならなかった（Ｐ＝０．５８０）。結果を表１１に示す。

【０１４２】

（気管病変および粘膜の厚さ）

中央値気管病変スコアを表１２に示す。病変は、グループ２（抗原接種しただけ）のトリで重篤であった。グループ２（陽性対照）のトリの中央値気管病変スコアは、他の３つのグループにおける中央値気管病変スコアとは有意に異なっていた（Ｐ＜０．０００１）。他のグループのトリの病変スコアは、互いに有意に異ならなかった。グループ２（抗原接種しただけ）のトリの上部、中央部および下部の気管の平均の粘膜の厚さは、他の３つのグループのトリの平均の粘膜の厚さよりも有意に大きかったが（Ｐ＜０．０００１）、これらの他の３つのグループのトリにおける平均の粘膜の厚さの間に有意差はなかった（表１２）。しかしながら、中央部および下部の気管において、平均の粘膜の厚さは、グループ１（Ｐ＝０．０２８）または３（Ｐ＝０．０３６）のトリにおけるよりもグループ４のトリにおいて小さかった。

【０１４３】

【表１３】

表 11 免疫防御研究におけるすべての実験グループのニワトリの体重増加

グループ	ワクチン接種	抗原接種	0日目	0－14日目	0－28日目	14－28日目
			体重(g)	増加分(%)	増加分(%)	増加分(%)
1	培地	培地	382±41	53±6[a]	106±12[a]	34±7[a,c,d]
2	培地	Wt Ap3AS	422±33	52±7[a]	94±13[b]	28±4[b]
3	ST変異体26-1	培地	387±43	48±10[a]	104±15[a]	38±6[c]
4	ST変異体26-1	Wt Ap3AS	415±58	50±9[a]	100±13[a,b]	33±6[d]

結果は、平均±標準偏差として表す。
同じ列の中の同じ上付き文字を伴う値は、有意には異ならない。
完全なデータは、付録Hに示す。

【０１４４】

【表１４】

表 12　免疫防御研究におけるトリの気管病変スコアおよび粘膜の厚さ

グループ	ワクチン接種	抗原接種	中央値気管病変（最小，最大）			気管の粘膜の厚さ±SD#（μm）		
			上部	中央部	下部	上部	中央部	下部
1	培地	培地	0 (0, 0.5)[a]	0 (0, 0)[a]	0 (0, 0)[a]	41 ± 6 [a]	32 ± 5 [a]	28 ± 4 [a]
2	培地	Wt Ap3AS *	2.5 (0.5, 3)[b]	2.5 (0.5, 3)[b]	2 (1, 3)[b]	233 ± 101 [b]	206 ± 107 [b]	173 ± 98 [b]
3	ST 変異体 26-1	培地	0 (0, 0.25)[a]	0 (0, 0.5)[a]	0 (0, 0.25)[a]	43 ± 11 [a]	34 ± 8 [a]	28 ± 6 [a]
4	ST 変異体 26-1	Wt Ap3AS	0 (0, 1)[a]	0 (0, 0.25)[a]	0 (0, 0)[a]	44 ± 14 [a]	28 ± 5 [c]	25 ± 3 [c]

* 野生型株 Ap3AS

SD：標準偏差

同じ列の中の同じ上付き文字を伴う値は、有意には異ならない。

完全なデータは、付録IIに示す。

【０１４５】

（実施例５：トリ病原性大腸菌（Ｐａｔｈｏｇｅｎｉｃ　Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）株Ｅ９５６（ＡＰＥＣ　Ｅ９５６）におけるｄｐｐＤおよびｏｐｐＤオリゴペプチドトランスポーター遺伝子のノックアウト変異体）

インビボ安全性研究から、ｄｐｐＤノックアウトまたは親Ｅ９５６と比べて、病変スコアおよびトリからの再単離率の両方に関して、ｏｐｐＤノックアウトの統計的に有意な弱毒化が示された。インビボ有効性研究から、ＡＰＥＣ　Ｅ９５６による抗原接種後の、ｏｐｐＤノックアウトのワクチン接種を受けたトリの統計的に有意な防御が示された。

【０１４６】

実施例１および実施例２は、細胞の中へのオリゴペプチドの輸送に関与する他の細菌性遺伝子に相同であるｄｐｐＤおよびｏｐｐＤ遺伝子を含めたいくつかの弱毒化する遺伝子変異を説明する。

【０１４７】

すべての細菌種がほぼ同一の輸送系を持つので、他の鳥病原体および他の動物種の病原体に対する新しいワクチンは、ｄｐｐＤノックアウトを生成することにより開発することができるであろう。

【０１４８】

この実施例は、トリ病原性大腸菌株Ｅ９５６（ＡＰＥＣ　Ｅ９５６）におけるｄｐｐＤおよびｏｐｐＤ遺伝子のノックアウトを説明する。各変異体を、抗原接種系を使用して安全性および有効性について試験した。

【０１４９】

（方法論）

Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）株、培地およびプラスミド

トリ病原性大腸菌株Ｅ９５６（ＡＰＥＣ　Ｅ９５６）は、もともとブロイラー飼育業者の農場で１日齢のヒナから単離され、抗生物質であるアンピシリン、スルファフラゾール、トリメトプリム、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、およびカナマイシンに感受性があるということが見出された。この生物を、特段の記載がない限り適切な抗生物質選択物（アンピシリン、５０ｕｇ／ｍｌ；カナマイシン、１００ｕｇ／ｍｌ）とともに、ルリア－ベルターニ培地（Ｌｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ　ｂｒｏｔｈ）（ＬＢ）中またはＬＢ寒天上で、３０℃または３７℃で一晩繁殖させた。Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）ＤＨ５α株を、標準的なクローニングおよびプラスミド産生のために使用した。

【０１５０】

アンピシリン耐性遺伝子、それぞれＧａｍ、Ｂｅｔ、およびＥｘｏをコードする３つの「Ｒｅｄ系」遺伝子γ、λ、およびｅｘｏを保有する温度に敏感なｐＫＤ４６プラスミド

を使用してノックアウト構築物と遺伝子ノックアウト標的との間の相同組み換えを促進するために、ｒｅｄリコンビナーゼ系を使用した。このノックアウト構築物は、ＰＣＲによって構築し、ｐＧＥＭ－Ｔベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）にライゲーションした。各構築物を含有するプラスミドをＰＣＲにおける鋳型として使用し、形質転換のための直鎖ＤＮＡを生成した。

【０１５１】

（遺伝子ノックアウト構築物の調製）

カナマイシン遺伝子を、オリゴヌクレオチドプライマーＴＸｋａｎＦｏｒおよびＴＹｋａｎＲｅｖ（表１３）を使用してトランスポゾンＴｎｐｈｏＡから増幅した。得られた１．０６４ｋｂｐ　ＰＣＲ産物を、ＵｌｔｒａＣｌｅａｎ　ＰＣＲ精製キット（ＭｏＢｉｏ、米国、カリフォルニア州）を製造業者の取扱説明書に従って使用して精製し、製造業者の手順書に従ってｐＧＥＭ－Ｔベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）にライゲーションした。このライゲーション混合物を使用して、２，５００Ｖ、２００Ω、２５０μＦの設定値を有するＧｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ（ＢｉｏＲａｄ）および２５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天上で選択した組み換え体を使用する電気穿孔によってＥ．ｃｏｌｉ（大腸菌）ＤＨ５αを形質転換した。形質転換体を２５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地の中で一晩成長させ、キット（Ｐｒｏｍｅｇａ）を製造業者の取扱説明書に従って使用してプラスミドを抽出した。カナマイシン耐性遺伝子のクローニングを制限エンドヌクレアーゼ分析によって検証した。直鎖ＤＮＡを形質転換のために使用した：ｄｐｐＤノックアウトについては、ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ（受入番号）　Ｌ０８３９９のｄｐｐＤ遺伝子の中のそれぞれ領域４３８４～４４２３ｂｐおよび４８２９～４８６８ｂｐに相補的な４０ｂｐの５’領域を各々含有するプライマー対ＷＥおよびＷＦを使用するＰＣＲによってＤＮＡを調製した。このＷＥおよびＷＦオリゴヌクレオチドプライマーは、当該カナマイシン遺伝子に相補的な２０ｂｐの３’領域を含有しており、ＰＣＲで使用されるとき、ｄｐｐＤ　ＤＮＡに相補的な４０ｂｐ末端を有するカナマイシン遺伝子を増幅した。

【０１５２】

【表１５】

表 13. この研究で使用したオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド	配列 (5'-3')	配列番号	PCR 産物
TXkanFor	tagactgggcggttttatgg	73	カナマイシン
TYkanRev	cgaagcccaacctttcatag	74	カナマイシン
TZ5'dppD	cgtagaccgcatcagctaca	75	dppD
UA3'dppD	gtgggtaatggcatttggac	76	dppD
WAKanFshort	cgttggctacccgtgatatt	77	カナマイシン
WE_dppD5'_kanF	ccgtcagcgagcgattgacctgctgaatcaggtcggtatttagactgggcggttttatgg	78	dppD/Kan 5'
WF_dppD3'_kanR	gcgggttaagcaggcagccgttcgggcggtcgtacttgcccgaagcccaacctttcatag	79	dppD/Kan 3'
WSoppDFor	gcactgctgaacgtgaaaga	80	oppD
WToppDRev	ctccaccggtttaaagcaag	81	oppD
WU1oppDRev+Kan	ccataaaaccgcccagtctatttttaccgcatcgagcatc	82	oppDアーム5'
WV2oppDFor+Kan	ctatgaaaggttgggcttcgtcgaccctaagctgctgattg	83	oppDアーム3'
Sidfwdseq	ctttccaccctgcacctaag	84	iucA
bwd siderophore	ctcacgggtgaaaatatttt	85	iucA
16Sfwd	gctgacgagtggcggacggg	86	16s RNA
16Srev	taggagtctggaccgtgtct	87	16s RNA

【０１５３】

（遺伝子ノックアウトの生成）

ＡＰＥＣ株Ｅ９５６を、２，５００Ｖ、２００Ω、２５０μＦに設定したＢｉｏ－Ｒａｄ　Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用する電気穿孔によって、ｐＫＤ４６を用いて形質転換した。３０℃で一晩のインキュベーション後に、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するルリア－ベルターニ寒天上で組み換え体を選択した。本発明者らは、公知の方法を使用する相同組み換えを通して遺伝子ノックアウトを生成した。ＡＰＥＣ　Ｅ９５６／ｐＫＤ４６の単一の新鮮なコロニーを、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する５ｍｌのＬＢの中に入れ、振盪しながら（２００ｒｐｍ）３０℃で１６時間インキュベーションした。翌日、一晩培養液の１：５０希釈物を、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する２０ｍｌのＬＢの量で作製し、この培養液を１２５ｍｌの三角フラスコの中、３０℃で振盪した（２００ｒｐｍ）。10^7細胞／ｍｌの濃度で、Ｌ－アラビノース（Ｓｉｇｍａ）を、１ｍＭの最終濃度になるように加えた。培養液を３０℃でおよそ１時間誘導し、次いでこの細胞に４２℃で１５分間熱ショックを与え、そして直ちに氷水浴に１０分間移し、次いで１０，０００×ｇで、４℃で１０分間の遠心分離によって集めた。この細胞を、２０％グリセロールを含有する１ｍｌの氷冷した１ｍＭ　ＭＯＰＳの中に再懸濁させ、１．５ｍｌ遠心管に移し、卓上型微量遠心機の中で１６，０００×ｇ、４℃で３０秒間遠心分離した。上清を取り除き、細胞を、２０％グリセロールを含有する１ｍｌの１ｍＭ　ＭＯＰＳの中に再懸濁させ、上記のように遠心分離した。この工程をもう一回繰り返し、最後に細胞を、２０％グリセロールを含有する１００μｌの１ｍＭ　ＭＯＰＳの中に再懸濁させた。次いでこの細胞を、予め冷却した電気穿孔キュベット（２ｍｍギャップ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に加え、ＤｐｎＩで消化したＤＮＡ　３００ｎｇを有する５０μｌの細胞を、上記の設定を使用して形質転換した。電気穿孔の直後に、０．３ｍｌのＬＢの中での懸濁によって細胞を回収し、２．７ｍｌのＬＢへと希釈し、振盪しながら３７℃で１．５時間インキュベーションした。この培養液をＬＢの中で５倍に濃縮し、０．２ｍｌを、２０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢプレート上に接種し、３７℃で

一晩インキュベーションした。４０ｕｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢの中で形質転換体を選択して成長させ、遺伝子ノックアウトをＰＣＲおよびサザンブロッティングによって確認した。

【０１５４】

（ｄｐｐＤおよびｏｐｐＤ遺伝子ノックアウト株の確認）

ｄｐｐＤまたはｏｐｐＤにおけるカナマイシン耐性遺伝子の挿入を検証するため、それぞれの遺伝子領域を増幅するためのｄｐｐＤ（ＴＺＩＵＡ）およびｏｐｐＤ（ＷＳＩＷＴ）についてのプライマー対を使用してＰＣＲを行った。ｄｐｐＤおよびｏｐｐＤについて、ＡＰＥＣ　Ｅ９５６親についてのＰＣＲ産物の予測されるサイズは、それぞれ０．８９ｋｂｐおよび０．９５１ｋｂｐであろう。当該カナマイシン遺伝子（１．０６４ｋｂｐ）の挿入に伴う予測されるサイズの増加は、ｄｐｐＤおよびｏｐｐＤについてそれぞれ１．７７４ｋｂｐおよび１．９２４ｋｂｐであろう。

【０１５５】

（ゲノムＤＮＡ抽出およびサザンブロット）

ＡＰＥＣ　Ｅ９５６、ΔｄｐｐＤ、およびΔｏｐｐＤ株のゲノムＤＮＡを、これまでに記載されたとおりに（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、２００１）フェノール／クロロホルムを使用して調製した。Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）株由来のゲノムＤＮＡをＰｓｔＩを用いて消化し、その断片を、分子量マーカーと一緒にアガロースゲル電気泳動によって分離した。アガロースゲル電気泳動の後、ゲノムＤＮＡ断片を、キャピラリートランスファーによってそのゲルからナイロン膜（Ｈｙｂｏｎｄ－Ｎ$^{+}$、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に移した。ランダムプライムドＤＮＡ標識キット（Ｒｏｃｈｅ）を使用してＤＮＡプローブを［γ^{32}Ｐ］ｄＡＴＰで標識した。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを、Ｃｈｕｒｃｈ緩衝液（０．５Ｍ　Na_2HPO_4［ｐＨ　７．４］、７％　ドデシル硫酸ナトリウム、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１％　ウシ血清アルブミン　ＢＳＡ）（Ｃｈｕｒｃｈ　＆　Ｇｉｌｂｅｒｔ、１９８４）の中で５４℃で一晩行った。膜を、２×ＳＳＣ（１×ＳＳＣは、０．１５Ｍ　ＮａＣＩに０．０１５Ｍクエン酸ナトリウムを加えたものである）－０．１％　ドデシル硫酸ナトリウムの中で２回（各々５４℃で５分間）、次いで０．５×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳの中で１回（６５℃で１５分間）洗浄し、ＫｏｄａｋＢｉｏＭａｘ　ＭＳフィルムを用いて－７０℃でオートラジオグラフにかけた。

【０１５６】

（ＡＰＥＣ　Ｅ９５６　ｄｐｐＤおよびｏｐｐＤノックアウトの安全性）

１日齢のヒナをＡＰＥＣ　Ｅ９５６、ΔｄｐｐＤ、およびΔｏｐｐＤ株に感染させ、未感染のものおよびＡＰＥＣ　Ｅ９５６に感染したものと比較して各変異体の病原性を評価した。全部で９５羽の１日齢のヒナを購入し（ＳＰＡＦＡＳ、ウッドエンドビクトリア（Ｗｏｏｄｅｎｄ　Ｖｉｃ））、各々２０羽のヒナの３つのグループおよび３５羽の１つのグループに割り振った。これらのトリを陽圧の隔離飼育器の中に収容し、照射した市販の幼鳥用飼料（ｓｔａｒｔｅｒ　ｆｅｅｄ）を自由に取らせた。各グループの各々２羽のヒナから排泄腔の拭き取り検体を採取し、共生Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）を評価するために、マッコンキー（ＭａｃＣｏｎｋｅｙ）寒天培地上に画線した。カナマイシンを含まないＥ９５６と一緒に４０ｕｇ／ｍｌのカナマイシンを含むニュートリエントブロス（ｎｕｔｒｉｅｎｔ　ｂｒｏｔｈ）中のＥ９５６　ΔｄｐｐＤ、ΔｏｐｐＤの一晩培養液を、１Ｅ＋１０コロニー形成単位／ｍｌ（ｃｆｕ／ｍｌ）の濃度を与えるように調製した。すべてのグループに、市販の伝染性気管支炎ウイルスワクチンＶｉｃ　Ｓ（Ｗｅｂｓｔｅｒｓ、オーストラリア）の通常の免疫用量の１０倍を用いて、点眼剤によって接種した。２０羽のヒナのグループ２および３は、各々、それぞれ１Ｅ＋１０ｃｆｕ／ｍｌのΔｄｐｐＤおよびΔｏｐｐＤを含有する２０ｍｌのエアロゾルを与えられ、一方で３５羽のトリのグループ４は、２０ｍｌの１Ｅ＋１０ｃｆｕ／ｍｌのＥ９５６が与えられた。グループ１のヒナは処置されず、陰性対照としての役割を果たした。グループ２、３および４からのヒナを、さらに２回、３日齢および５日齢のときに同じＡＰＥＣ株に曝露した。すべてのトリを、１０日齢のときに死体解剖にかけた。肉眼所見によって疾患を評価し、気

嚢病変を前述の基準に従って採点した。拭き取り検体を、左右の後気嚢および前気嚢、気管からおよび無菌で肝臓から採取した。これらの拭き取り検体を、カナマイシン（４０ｕｇ／ｍｌ）を伴って、および伴わずにマッコンキー寒天培地の上に接種し、３７℃で一晩インキュベーションした。翌日、プレートを、「レンガの赤色の」コロニー（典型的なＥ．ｃｏｌｉ（大腸菌）表現型）の存在について観察し、それらの数を数え記録した。コロニーの数が３０未満である場合、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）株を同定するためにＰＣＲを行った。プライマー対を使用してＡＰＥＣ株を同定した：ｄｐｐＤについてはＷＡ／ＵＡ、ｏｐｐＤについてはＷＡ／ＷＴ、Ｅ９５６については、ｐＶＭ０１上に存在するｉｕｃＡ遺伝子を増幅するＳｉｄｆｗｄｓｅｑ／ｂｗｄ　ｓｉｄｅｒｏｐｈｏｒｅ（表１３）。共生Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）については１６Ｓｆｗｄ／１６Ｓｒｅｖを用いて１６ｓ　ｒＤＮＡを増幅した。

【０１５７】

（ＡＰＥＣ　ｄｐｐＤおよびｏｐｐＤノックアウトの有効性）

Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）ワクチン候補の有効性を評価するために、６０羽の１日齢のトリを、各々２０羽のトリの３つのグループに分割した。グループ２および３を、上記のように１日目にＥ９５６　ΔｄｐｐＤ、ΔｏｐｐＤでエアロゾルでワクチン接種し、一方、グループ１は対照としてワクチン接種しないまま残し、上記のように隔離飼育器の中に別々に収容した。ワクチン接種後１２日目に、すべてのグループを、上記のように１Ｅ＋１０ｃｆｕ／ｍｌのＡＰＥＣ　Ｅ９５６を含有する２０ｍｌのエアロゾルで別々に抗原接種し、それらの隔離飼育器に戻した。４日後、すべてのトリをハロタンの吸入によって安楽死させ、死体解剖にかけた。気嚢病変スコアを上記のように評価し、感染性の生物の再単離のために採取した拭き取り検体を、カナマイシン（４０ｕｇ／ｍｌ）を含む、および含まないマッコンキー寒天培地で培養した。

【０１５８】

（結果の解析）

気嚢病変スコアの率および程度、生物の単離率およびトリの体重増加について統計解析を行った。使用した検定は、再単離率についてはフィッシャーの正確確率検定（Ｆｉｓｈｅｒ’ｓ　Ｅｘａｃｔ　Ｔｅｓｔ）、および病変スコアおよび体重変化についてはマンホイットニーのＵ検定であった。

【０１５９】

（結果）

ＡＰＥＣ　Ｅ９５６　ΔｄｐｐＤ、およびΔｏｐｐＤの開発および検証

ＰＣＲによって生成される特定の遺伝子ノックアウトについての直鎖ＤＮＡ構築物を使用して、ＡＰＥＣ　Ｅ９５６／ｐＫＤ４６を形質転換した。４０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天上で形質転換体を選択し、次いでクローンがカナマイシン遺伝子を保有しているかを確認するためにＰＣＲを行った。オリゴヌクレオチドプライマー対ＴＺ／ＵＡを使用したＥ９５６　ΔｄｐｐＤからの増幅産物のサイズは、Ｅ９５６親株（０．８９ｋｂｐ）と比べて、カナマイシンＤＮＡ（１．０６４ｋｂｐ）の挿入に起因して１．７７４ｋｂｐであると予測された。図８Ａおよび図９、パネルＡ、それぞれレーン２および１。同様に、オリゴヌクレオチドプライマー対ＷＳ／ＷＴを使用するＥ９５６　ΔｏｐｐＤについての増幅産物のサイズは、１．９２４ｋｂｐという予測されたサイズに近かったが、Ｅ９５６親株は０．９５１ｋｂｐの増幅産物を生成した。図８Ｂおよび図９、パネルＢ、それぞれレーン１および２。

【０１６０】

ＰｓｔＩ制限酵素を用いてＡＰＥＣ株Ｅ９５６、ΔｄｐｐＤおよびΔｏｐｐＤのゲノムＤＮＡを消化した。当該カナマイシン耐性遺伝子は、遺伝子の中央部に１つのＰｓｔＩ部位を有するため、この酵素を選んだ。ｄｐｐＤおよびｏｐｐＤ放射標識プローブは、ＡＰＥＣ　Ｅ９５６、ΔｄｐｐＤおよびΔｏｐｐＤ株においてバンドを検出した（図１０）。ｄｐｐＤプローブはＥ９５６およびΔｏｐｐＤ株の同様のサイズの断片に結合したが（図１０、レーン１および３）、わずかにより小さい分子量バンドおよび２ｋｂｐの別のバン

ドに結合した。ｏｐｐＤプローブは、Ｅ９５６およびΔｄｐｐＤ株の同様のサイズの断片に結合し（図１０、レーン１および２）、ΔｄｐｐＤでは９．８ｋｂｐおよび７ｋｂｐのバンドに結合した（図１０、レーン３）。このカナマイシン遺伝子プローブは、Ｅ９５６には結合しなかったが、ΔｄｐｐＤおよびΔｏｐｐＤ株においてｄｐｐＤおよびｏｐｐＤプローブが結合したものと同じバンドに結合した（図１０、レーン１および２）。

【０１６１】

（Ｅ９５６　ΔｄｐｐＤおよびΔｏｐｐＤ株を使用する病原性研究）

大腸菌症の徴候について死体解剖時にニワトリを調べ、６つの気嚢を病変について調べ、ワクチン、親生物または共生生物の再単離のために、各トリの左右の前気嚢、気管および肝臓から試料拭き取り検体を採取した。これらの拭き取り検体を、カナマイシンを加えてまたは加えずにマッコンキー寒天培地上にプレーティングした。これらの研究からの結果は以下で論じる。結果は表１４、１６および１９に要約してあり、これらのグループの各々の間で行った統計比較は、表１５、１７、１８、２０および２１に要約する。

【０１６２】

【表１６】

表 14. 病原性および有効性実験におけるニワトリの体重増加

	% 体重増加 (g)		
	病原性実験	有効性実験	
抗原接種 (トリの数)	PM-ワクチン接種	抗原接種-ワクチン接種	PM-抗原接種
なし (20)^	174.5±30.6[a]	-	-
E956 (23)^	143.0±40.5[b]	-	-
抗原接種のみ (20)*	-	269±29.6[a]	17.9±3.7[a]
Δ*dppD* (19)^, (19)*	143.0±40.5[b]	255±54.0[a]	19.3±3.1[a]
Δ*oppD* (20)^, (20)*	155.0±31.1[ab]	255±49.0[a]	18.4±2.4[a]

^病原性実験。 ＊有効性実験。同じ列の中の同じ上付き記号を伴う値は、有意には異ならない。
(P≥0.05, スチューデントのT-検定　両側)

【０１６３】

【表１７】

表 15. 表14からの体重増加の統計解析についての確率 (P) 値

	病原性実験		
	Δ*dppD*	Δ*oppD*	E956
ワクチン接種なし	0.006	0.053	0.007
Δ*dppD*		0.237	0.995
Δ*oppD*			0.291

	有効性試験	
	Δ*dppD*	Δ*oppD*
ワクチン接種なし	0.302	0.257
Δ*dppD*		0.990

【０１６４】

【表１８】

表 16. *E. coli* (大腸菌) E956株と比較した *oppD* および *dppD* ノックアウトの安全性

抗原接種株	再単離率 抗生物質なし				中央値単離数 (Log_{10}+1) 抗生物質なし (範囲)		気嚢病変率	中央値病変スコア
(トリの数)	LPT気嚢	RPT気嚢	気管	肝臓	左+右 気嚢	気管	(>0.5)	(範囲)
なし (20)	2/20	3/20	11/20	4/20	0.00 (0-0.48)[a]	0.00 (0-3.70)[a]	0/20[a]	0.0 (0-0.0)[a]
E956 (23)	11/23	11/23	21/23	3/23	0.48 (0-4.00)[c]	2.48 (0-3.70)[c]	17/23[b]	3.0 (0-20)[b]
Δ*dppD* (19)	10/19	11/19	16/19	8/19	2.08 (0-4.00)[bc]	1.93 (0-3.70)[b]	11/19[bc]	1.0 (0-16)[bc]
Δ*oppD* (20)	9/20	7/20	10/20	4/20	0.00 (0-4.00)[ab]	0.85 (0-3.70)[a]	9/20[c]	0.0 (0-20)[c]

同じ列の中の同じ上付き記号を伴う値は、有意には異ならない (マンホイットニー検定、フィッシャーの両側正確確率検定によって、P≥0.05)

【０１６５】

【表１９】

表17．表16からの気嚢および気管の再単離率の統計解析についての確率(P)値

	気嚢				気管		
株	E956	Δ*dppD*	Δ*oppD*		E956	Δ*dppD*	Δ*oppD*
ワクチンなし	0.017	0.0105	0.0399		7e-06	0.0005	0.3589
E956		0.4299	0.1696			0.0238	0.00012
Δ*dppD*			0.1231				0.0089

マンホイットニー検定

【０１６６】

【表２０】

表18．表16からの気嚢の病変スコアおよび病変率の統計解析についての確率(P)値

	病変スコア*				病変率^		
株	E956	Δ*dppD*	Δ*oppD*		E956	Δ*dppD*	Δ*oppD*
ワクチンなし	1e-05	0.0003	0.0154		0.008	0.00001	0.000003
E956		0.092	0.0065			0.0561	0.112
Δ*dppD*		-	0.1415				1.0

*マンホイットニー検定，^フィッシャーの両側正確確率検定

【０１６７】

【表２１】

表19．*E. coli*（大腸菌）E956株，*oppD*および*dppD*ノックアウトを使用する有効性研究

抗原接種	再単離率				中央値単離数 (Log_{10}+1)		気嚢	中央値
(トリの数)	抗生物質なし				抗生物質なし(範囲)		病変率	病変スコア
	LPT気嚢	RPT気嚢	T気管	肝臓	左+右気嚢	気管	(>0.5)	(範囲)
E956 (20)	2/20	1/20	8/20	0/20	0.00 (0-2.25)[a]	0.15 (0-1.88)[a]	13/20[a]	1.25 (0-4.5)[a]
Δ*oppD* (20)	1/20	0/20	9/20	0/20	0.00 (0-1.43)[a]	0.00 (0-2.80)[a]	6/20[b]	0.0 (0-14)[b]

同じ列の中の同じ上付き記号を伴う値は、有意には異ならない（マンホイットニー検定またはフィッシャーの両側正確確率検定によって、P≥0.05）

【０１６８】

【表２２】

表20．表19からの気嚢および気管の再単離率の統計解析についての確率(P)値

	気嚢		気管
株	抗原接種のみ		抗原接種のみ
Δ*oppD*	0.130		0.0004

マンホイットニー検定

【０１６９】

【表２３】

表21．表19からの気嚢の病変スコアおよび病変率の統計解析についての確率(P)値

	病変スコア*		病変率^
株	抗原接種のみ		抗原接種のみ
Δ*oppD*	0.011		0.052

*マンホイットニー検定，^フィッシャーの両側正確確率検定

【０１７０】

（トリの体重増加）

Ｅ９５６（１４３％）、ΔｄｐｐＤ（１４３％）およびワクチン接種を受けていないニワトリ（１７４％）の間の、病原性実験における体重増加の百分率の差は、ほとんど有意

ではなく、一方で、ワクチン接種を受けていないトリの体重増加の百分率に対するΔｏｐｐＤ（１５５％）に関しては有意差は見られなかった（表１４および１５）。有効性実験では、抗原接種前または死体解剖時におけるいずれのトリのグループの体重増加の百分率においても統計的な有意差はなかった（表１４および１５）。

【０１７１】

（マッコンキー寒天培地上での生物の再単離率）

病原性実験において、対照およびΔｏｐｐＤワクチン接種を受けたトリの気嚢または気管から再単離した生物の中央数の間に有意差はなかった（表１６）。ワクチン接種を受けていないトリよりもＥ９５６またはΔｄｐｐＤでワクチン接種を受けたトリからより多くの数の生物が単離された（表１６）。有効性実験についての結果（表１９）は、Ｅ９５６抗原接種したトリとΔｏｐｐＤワクチン接種を受けたトリとの間で差を示さなかった。Δｄｐｐ ＤまたはΔｏｐｐＤのいずれかでワクチン接種を受けたトリの中の気管　対　気嚢からなされた単離率に有意差はなかったが、気嚢と比べて、気管からの生物の単離の有意な増加が、Ｅ９５６を用いてワクチン接種を受けたトリに関して観察された（Ｐ＜０．０５）。

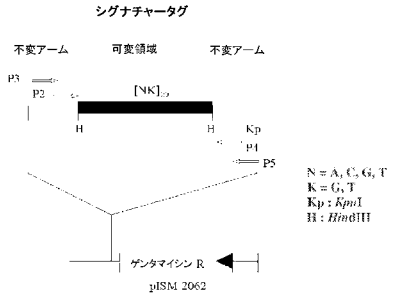
【０１７２】

（気嚢病変率）

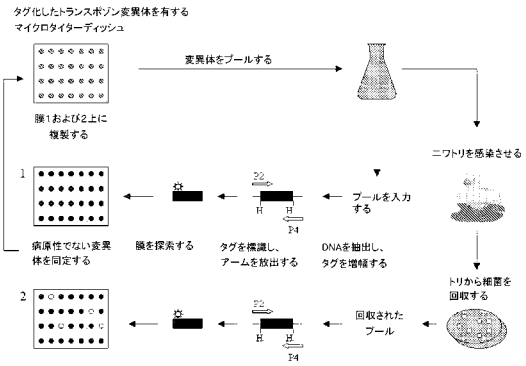
死体解剖時の気嚢および器官の検討から、いくつかのトリにおいて大腸菌症の徴候が示され、肝周囲炎および心膜炎が観察された。病原性実験においては、気嚢の率および病変スコアにおいてΔｄｐｐＤまたはΔｏｐｐＤのいずれかでワクチン接種を受けたトリの間で統計的に有意な差はなく、ΔｏｐｐＤとＥ９５６との間でより少ない病変が観察されたが、ΔｄｐｐＤでワクチン接種を受けたトリとＥ９５６でワクチン接種を受けたトリとの間で統計学的差異はなかった（表１６および１８）。防御実験では、ΔｏｐｐＤワクチン接種を受けかつＥ９５６で抗原接種したトリの病変率およびスコアの比較から、ΔｏｐｐＤを用いた先立つワクチン接種からの統計的に有意な保護効果が示され、ワクチン接種を受けたグループについて０．０およびワクチン接種を受けずに抗原接種したグループについては１．２５の中央値病変率が示された（表１９および２１）。

【図１】

A.

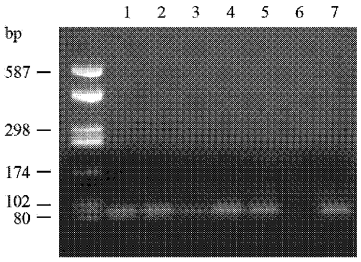


B.



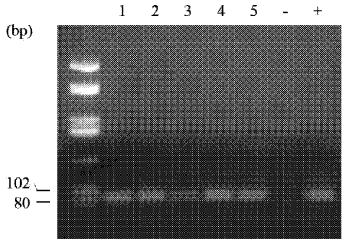
【図２】

Figure 2

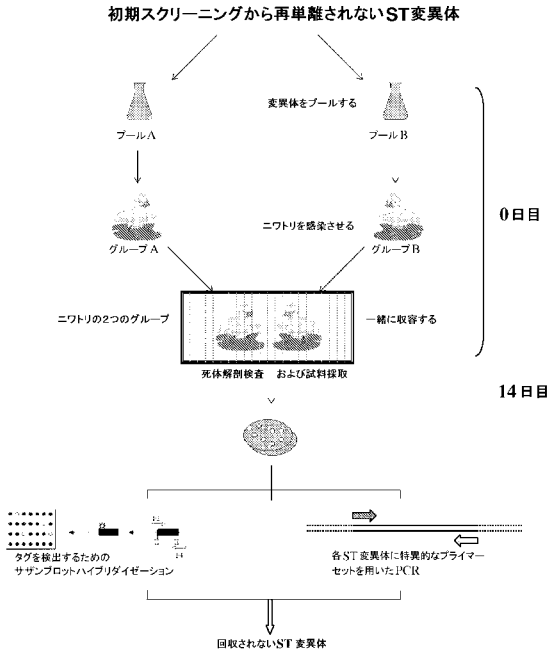


【図３】

Figure 3

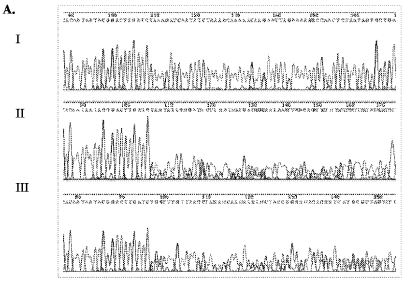


【図４】



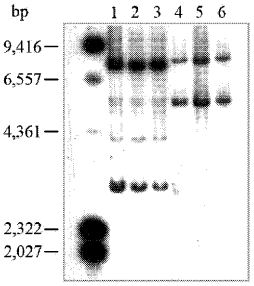
【図５Ａ】

A.

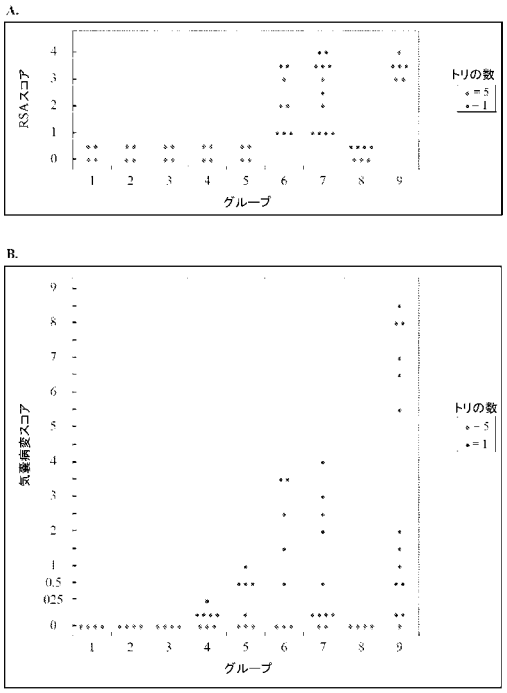


【図５Ｂ】

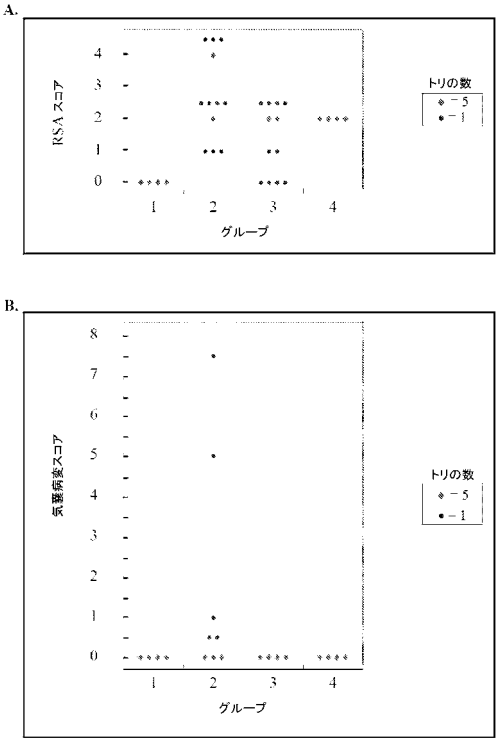
B.



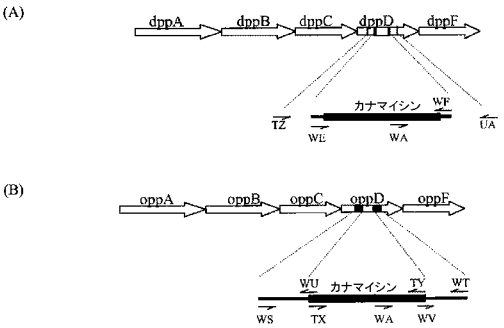
【図６】



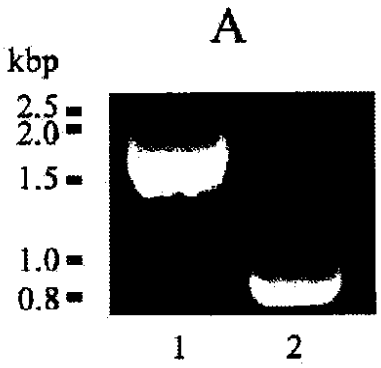
【図７】



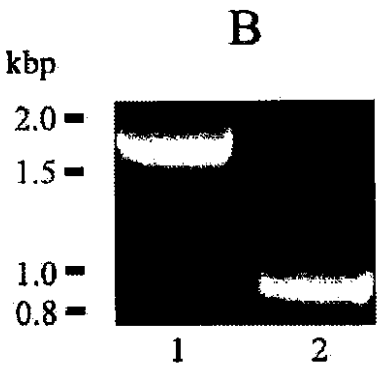
【図８】



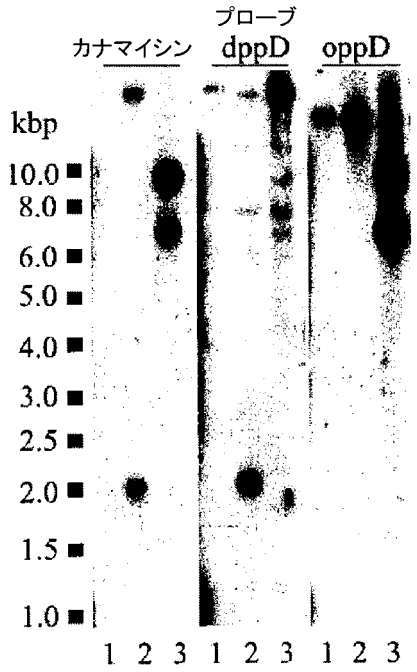
【図９Ａ】



【図９Ｂ】



【図１０】



【配列表】
2012518388000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成22年12月20日(2010.12.20)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも１つのＡＢＣペプチドトランスポーター遺伝子の変異によって弱毒化された細菌であって、前記変異は、コードされたＡＢＣペプチドトランスポータータンパク質を非機能的にし、前記弱毒細菌は対象の中で生き残ることができる、細菌。
【請求項２】
前記変異は、挿入、欠失、置換またはこれらのいずれかの組み合わせによって生成される、請求項１に記載の細菌。
【請求項３】
前記挿入変異は、相同組み換え、トランスポゾン変異または配列タグ変異誘発のいずれか１つまたはそれらのいずれかの組み合わせによってもたらされる、請求項２に記載の細菌。
【請求項４】
前記ＡＢＣペプチドトランスポーター遺伝子は、ＣｖａＢ、ＣｙｌＢ、ＳｐａＢ、ＮｉｓＴ、ＥｐｉＴ、ＰｅｄＤ、ＬｃｎＣ、ＭｃｂＥＦ、ＯｐｐＤおよびＤｐｐＤ、およびこれらの相同体を含む群から選択される、請求項１から請求項３のいずれか１項に記載の細

菌。
【請求項５】
前記ＡＢＣペプチドトランスポーター遺伝子はＤｐｐＤである、請求項４に記載の細菌。
【請求項６】
前記ＡＢＣペプチドトランスポーター遺伝子はＯｐｐＤである、請求項４に記載の細菌。
【請求項７】
前記細菌は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ（アビバクテリウム）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（バチルス）、Ｂｒｕｃｅｌｌａ（ブルセラ）、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ（バルトネラ）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ（ボルデテラ）、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ（バークホルデリア）、Ｖｉｂｒｉｏ（ビブリオ）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（大腸菌類、エシェリキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（サルモネラ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ（クロストリジウム）、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ（カンピロバクター）、Ｃｈａｌｍｙｄｉａ（クラミジア）、Ｃｏｘｉｅｌｌａ（コクシエラ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ（エリシペロスリクス）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ（フランシセラ）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ（リステリア）、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ（アクチノバチルス）、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ（ヘモフィルス）、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ（ヘリコバクター）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ（エロモナス）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ（ストレプトコッカス、連鎖球菌）、Ｓｈｉｇｅｌｌａ（赤痢菌）、Ｙｅｒｓｉｎｉａ（エルシニア）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（マイコバクテリウム）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ（マンヘミア）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（オルニソバクテリウム）、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ（リケッチア）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ（ウレアプラズマ）、およびＰａｓｔｅｕｒｅｌｌａ（パスツレラ）を含む群から選択される、請求項１から請求項３のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項８】
前記細菌は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｇａｌｌｉｎａｒｕｍ（アビバクテリウム・パラガリナルム）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ａｖｉｕｍ（ボルデテラ・アビウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅａｌｅ（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ（腸炎菌）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ（パスツレラ・マルトシダ）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ（マンヘミア・ヘモリチカ、ヘモリチカ菌）、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ（クロストリジウム・パーフリンジェンス、ウェルシュ菌）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｇａｌａｃｔｉａｅ（マイコプラズマ・アガラクチアエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｋａｌｅｓｃｅｎｓ（マイコプラズマ・アルカレッセンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎａｔｉｓ（マイコプラズマ・アナティス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎｓｅｒｉｓ（マイコプラズマ・アンセリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｍｉｔａｎｓ（マイコプラズマ・イミタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｇｉｎｉｎｉ（マイコプラズマ・アルギニニ）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｐａｒｖｕｍ（ウレアプラズマ・パルハム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ（マイコプラズマ・アルスリチジス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ボビゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ボビリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｓ（マイコプラズマ・ボビス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ（マイコプラズマ・ボーボクリ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃｕｍ（マイコプラズマ・カリフォルニカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｒｉｃｏｌｕｍ（マイコプラズマ・カプリコルム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｄｉｓｐａｒ（マイコプラズマ・ディスパー）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・フェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ（マイコプラズマ・ファーメンタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ゲニタリウム）、Ｍ

ｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｏｍｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ホミニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ハイオリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオシノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｏｗａｅ（マイコプラズマ・アイオワエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｌａｒｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ａｎｄ ｓｍａｌｌ ｃｏｌｏｎｙ（マイコプラズマ・ミコイデス ミコイデス大コロニー型および小コロニー型）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｒａｌｅ（マイコプラズマ・オラーレ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓ（マイコプラズマ・ペネトランス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｖｉｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・オビニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｕｌｌｏｒｕｍ（マイコプラズマ・プローラム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｌｉｇａｔｏｒｕｓ（マイコプラズマ・アリガトラス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ニューモニエ、肺炎マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍａｌｅａｇｒｉｄｉｓ（マイコプラズマ・メレアグリディス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・ヘモフェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｍｉｎｕｔｕｍ（マイコプラズマ・ヘモマイニュータム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍａｔｏｐａｒｖｕｍ（マイコプラズマ・ヘマトパルハム）である、請求項７に記載の細菌。

【請求項９】

前記細菌は、トリ病原性大腸菌株Ｅ９５６、またはＭｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）株Ａｐ３ＡＳである、請求項８に記載の細菌。

【請求項１０】

前記弱毒細菌は異種抗原を発現する、請求項１から請求項９のいずれか１項に記載の細菌。

【請求項１１】

前記異種抗原は、同じまたは別の病原生物のいずれか由来の核酸によってコードされる、請求項１０に記載の細菌。

【請求項１２】

前記異種抗原をコードする核酸は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ（アビバクテリウム）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（バチルス）、Ｂｒｕｃｅｌｌａ（ブルセラ）、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ（バルトネラ）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ（ボルデテラ）、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ（バークホルデリア）、Ｖｉｂｒｉｏ（ビブリオ）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（大腸菌類、エシェリキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（サルモネラ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ（クロストリジウム）、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ（カンピロバクター）、Ｃｈａｌｍｙｄｉａ（クラミジア）、Ｃｏｘｉｅｌｌａ（コクシエラ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ（エリシペロスリクス）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ（フランシセラ）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ（リステリア）、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ（アクチノバチルス）、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ（ヘモフィルス）、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ（ヘリコバクター）、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ（エロモナス）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ（ストレプトコッカス、連鎖球菌）、Ｓｈｉｇｅｌｌａ（赤痢菌）、Ｙｅｒｓｉｎｉａ（エルシニア）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（マイコバクテリウム）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ（マンヘミア）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ（オルニソバクテリウム）、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ（リケッチア）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ（ウレアプラズマ）、およびＰａｓｔｅｕｒｅｌｌａ（パスツレラ）、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択される属から単離される、請求項１１に記載の細菌。

【請求項１３】

前記異種抗原をコードする核酸は、Ａｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒａｇａｌｌｉｎａｒｕｍ（アビバクテリウム・パラガリナルム）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ａｖｉｕｍ（ボルデテラ・アビウム）、Ｏｒｎｉｔｈｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅａｌｅ（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ（腸炎菌）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ（パスツレラ・マルトシダ）、Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ（マンヘミア・ヘモリチカ、ヘモリチカ菌）、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ（クロストリジウム・パーフリンジェンス、ウェルシュ菌）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｇａｌａｃｔｉａｅ（マイコプラズマ・アガラクチアエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｋａｌｅｓｃｅｎｓ（マイコプラズマ・アルカレッセンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎａｔｉｓ（マイコプラズマ・アナティス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｎｓｅｒｉｓ（マイコプラズマ・アンセリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｍｉｔａｎｓ（マイコプラズマ・イミタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｇｉｎｉｎｉ（マイコプラズマ・アルギニニ）、Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｐａｒｖｕｍ（ウレアプラズマ・パルハム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ（マイコプラズマ・アルスリチジス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ボビゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ボビリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｉｓ（マイコプラズマ・ボビス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ（マイコプラズマ・ボーボクリ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃｕｍ（マイコプラズマ・カリフォルニカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｒｉｃｏｌｕｍ（マイコプラズマ・カプリコルム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｄｉｓｐａｒ（マイコプラズマ・ディスパー）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・フェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ（マイコプラズマ・ファーメンタンス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇｅｎｉｔａｌｉｕｍ（マイコプラズマ・ゲニタリウム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｏｍｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ホミニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ（マイコプラズマ・ハイオリニス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈｙｏｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・ハイオシノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｉｏｗａｅ（マイコプラズマ・アイオワエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｍｙｃｏｉｄｅｓ ｌａｒｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ａｎｄ ｓｍａｌｌ ｃｏｌｏｎｙ（マイコプラズマ・ミコイデス ミコイデス大コロニー型および小コロニー型）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｙｎｏｖｉａｅ（マイコプラズマ・シノビエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｒａｌｅ（マイコプラズマ・オラーレ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｅｎｅｔｒａｎｓ（マイコプラズマ・ペネトランス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｏｖｉｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・オビニューモニエ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｕｌｌｏｒｕｍ（マイコプラズマ・プローラム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ａｌｌｉｇａｔｏｒｕｓ（マイコプラズマ・アリガトラス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（マイコプラズマ・ニューモニエ、肺炎マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ（マイコプラズマ）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｍａｌｅａｇｒｉｄｉｓ（マイコプラズマ・メレアグリディス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｆｅｌｉｓ（マイコプラズマ・ヘモフェリス）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍｏｍｉｎｕｔｕｍ（マイコプラズマ・ヘモマイニュータム）、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｈａｅｍａｔｏｐａｒｖｕｍ（マイコプラズマ・ヘマトパルハム）、またはこれらのいずれかの組み合わせに由来する、請求項１２に記載の細菌。

【請求項１４】

前記異種抗原をコードする核酸は、ニューカッスル病ウイルス、伝染性気管支炎ウイルス、トリニューモウイルス、鶏痘、伝染性ファブリキウス嚢病、伝染性喉頭気管炎ウイルス、鳥インフルエンザ、アヒルウイルス性肝炎、アヒルウイルス性腸炎、ニワトリ貧血、マレック病ウイルスまたはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択されるウイル

スから単離される、請求項１３に記載の細菌。
【請求項１５】
前記対象は脊椎動物である、請求項１から請求項１４のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項１６】
前記脊椎動物は、ヒト、ウシ亜科の動物、イヌ科の動物、ネコ科の動物、ヤギ亜科の動物、ヒツジ属の動物、ブタ類の動物、ラクダ科の動物、ウマ科の動物および鳥類を含む群から選択される、請求項１５に記載の細菌。
【請求項１７】
前記ウシ亜科の動物対象は雌ウシ、雄ウシ、バイソンまたはバッファローであり、前記イヌ科の動物対象はイヌであり、前記ネコ科の動物対象はネコであり、前記ヤギ亜科の動物対象はヤギであり、前記ヒツジ属の動物対象はヒツジであり、前記ブタ類の動物対象はブタであり、前記ラクダ科の動物対象はラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、ビクーナまたはグアナコであり、前記ウマ科の動物対象はウマ、ロバ、シマウマまたはラバである、請求項１５に記載の細菌。
【請求項１８】
前記鳥類対象は、いずれかの商業的にまたは家庭で飼育される鳥類である、請求項１５に記載の細菌。
【請求項１９】
前記鳥類は、ニワトリ（チャボを含む）、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、キジ、ウズラ、ヤマウズラ、ハト、ホロホロチョウ、ダチョウ、エミューまたはクジャクを含む群から選択される、請求項１８に記載の細菌。
【請求項２０】
細菌を弱毒化するための方法であって、前記方法は、少なくとも１つのＡＢＣトランスポーター遺伝子に変異導入することを含み、請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の弱毒細菌は対象の中で生き残る、方法。
【請求項２１】
対象における疾患の予防または寛解の方法であって、前記方法は、治療上有効用量のワクチン組成物または免疫原性組成物を前記対象に投与することを含み、前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌を含む、方法。
【請求項２２】
疾患の予防の方法であって、前記方法は、治療上有効用量のワクチン組成物または免疫原性組成物を、予防を必要とする対象に投与することを含み、前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌を含む、方法。
【請求項２３】
請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌を含む免疫原性組成物。
【請求項２４】
免疫原性上有効量の請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌と、薬理学的に許容できる担体とを含む、ワクチン組成物。
【請求項２５】
疾患の処置または予防のためのワクチン組成物の使用であって、前記ワクチン組成物は、請求項１から請求項１９のいずれか１項に記載の少なくとも１つの弱毒細菌を含む、使用。
【請求項２６】
前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、水、生理食塩水、培養液、安定剤、炭水化物、タンパク質、タンパク質含有薬剤（ウシ血清もしくは脱脂粉乳など）および緩衝液またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択される少なくとも１つの薬学的に許容できる担体または希釈剤をさらに含む、請求項２３に記載の免疫原性組成物または請

求項２４に記載のワクチン組成物。
【請求項２７】
前記安定剤はＳＰＧＡであってもよい、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項２８】
前記炭水化物は、ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、グルコース、デキストランまたはこれらの組み合わせを含む群から選択される、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項２９】
前記タンパク質はアルブミンまたはカゼインである、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項３０】
前記タンパク質含有薬剤はウシ血清または脱脂粉乳である、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項３１】
前記緩衝液は、マレイン酸塩、リン酸塩、ＣＡＢＳ、ピペリジン、グリシン、クエン酸塩、リンゴ酸塩、ギ酸塩、コハク酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、ピペラジン、ピリジン、カコジル酸塩、コハク酸塩、ＭＥＳ、ヒスチジン、ビス－トリス、リン酸塩、エタノールアミン、ＡＤＡ、炭酸塩、ＡＣＥＳ、ＰＩＰＥＳ、イミダゾール、ビス－トリスプロパン、ＢＥＳ、ＭＯＰＳ、ＨＥＰＥＳ、ＴＥＳ、ＭＯＰＳＯ、ＭＯＢＳ、ＤＩＰＳＯ、ＴＡＰＳＯ、ＴＥＡ、ピロリン酸塩、ＨＥＰＰＳＯ、ＰＯＰＳＯ、トリシン、ヒドラジン、グリシルグリシン、ＴＲＩＳ、ＥＰＰＳ、ビシン、ＨＥＰＢＳ、ＴＡＰＳ、ＡＭＰＤ、ＴＡＢＳ、ＡＭＰＳＯ、タウリン、ホウ酸塩、ＣＨＥＳ、グリシン、水酸化アンモニウム、ＣＡＰＳＯ、炭酸塩、メチルアミン、ピペラジン、ＣＡＰＳ、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択される、請求項２６に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項３２】
前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は凍結乾燥されているかまたはフリーズドライ状態にある、請求項２３から請求項３１のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項３３】
少なくとも１つのアジュバントをさらに含む、請求項２３から請求項３２のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項３４】
前記アジュバントは、フロインド完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、ビタミンＥ、非イオン性ブロックポリマー、ムラミルジペプチド、サポニン、鉱油、植物油、カルボポール　水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、油乳剤サポニン、ビタミンＥ可溶化物またはこれらのいずれかの組み合わせを含む群から選択される、請求項３３に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項３５】
前記アジュバントはＥ．ｃｏｌｉ（大腸菌）易熱性毒素またはコレラ毒素である、請求項３３に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項３６】
前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、鼻腔内に、眼内に、皮内に、腹腔内に、静脈内に、皮下に、経口で、排泄腔に、エアロゾルによって（噴霧型ワクチン接種）または筋肉内に投与される、請求項２３から請求項３５のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【請求項３７】
前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、羽弁投与または点眼剤投与によって投与される、請求項２３から請求項３６のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原

性組成物。
【請求項３８】
前記ワクチン組成物または免疫原性組成物は、１用量あたり少なくとも約10^{3}～約10^{5}弱毒細菌、または約10^{5}～約10^{7}弱毒細菌、または約10^{7}～約10^{9}弱毒細菌、または約10^{9}～約10^{11}弱毒細菌、または約10^{11}～約10^{13}弱毒細菌、または約10^{13}～約10^{15}弱毒細菌、または約10^{15}～約10^{17}弱毒細菌、または約10^{17}～約10^{19}、または少なくとも約10^{19}弱毒細菌を含む、請求項２３から請求項３７のいずれか１項に記載のワクチン組成物または免疫原性組成物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１６】
１つの実施形態では、このＡＢＣトランスポーター遺伝子は、ＡＢＣペプチドトランスポータータンパク質をコードする遺伝子であってもよい。例えばＣｖａＢ、ＣｙｌＢ、ＳｐａＢ、ＮｉｓＴ、ＥｐｉＴ、ＰｅｄＤ、ＬｃｎＣ、ＭｃｂＥＦ、ＯｐｐＤおよびＤｐｐＤ、およびこれらの相同体、特にＡＢＣトランスポーター遺伝子はＯｐｐＤをコードしてもよい。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４４】
特に興味がもたれるものは、例えばＣｖａＢ（Ｅ ｃｏｌｉ（大腸菌））、ＣｙｌＢ（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ（エンテロコッカス・フェカリス、フェカリス菌））、ＳｐａＢ（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ（バチルス・スブチリス、枯草菌））、ＮｉｓＴ（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ（ラクトコッカス・ラクティス、ラクチス乳酸菌） ６Ｆ３）、ＥｐｉＴ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ（スタフィロコッカス・エピデルミデス、表皮ブドウ球菌））、ＰｅｄＤ（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ ａｃｉｄｉｌａｃｔｉｃｉ（ペディオコッカス・アシディラクティシ））、ＬｃｎＣ（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ（ラクトコッカス・ラクティス ラクチス型））、ＭｃｂＥＦ（Ｅ ｃｏｌｉ（大腸菌）） ＯｐｐＤおよびＤｐｐＤ（Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）およびＭ．ｇａｌｌｉｓｅｐｔｉｃｕｍ（マイコプラズマ・ガリセプチカム））ならびに他の種の中のこれらの相同体を含むＡＢＣペプチドトランスポーターである。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2010/000172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.

C12N 1/36 (2006.01) *A61K 39/02* (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, EPODOC, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE: Keywords (ABC transporter, attenuated, bacteria) and like terms

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/034773 A2 (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD.) 2 May 2002 The whole document, but particularly abstract, page 3, lines 10-17 and 22-27; page 6, lines 3-17; page 6, line 18 – page 7, line 20; Table 2; page 21, lines 16-32; page 25, line 25; claims 7-12, 14, 22 and 23.	1-38
X	ROSHINA, G. M. S ET AL., 'Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice', Infection and Immunity, 2002, vol. 670, no. 9, pages 5036-5044 The whole document, but particularly abstract; page 5037, column 1, paragraph 1; page 5037, column 2, paragraph 2 – page 5038, column 1, paragraph 2; page 5042, column 1, paragraphs 2 and 3; table 2; figure 6; page 5043, column 2, paragraph 2	1-9, 15-38
X	WO 2004/089408 A2 (XENOVA RESEARCH LIMITED) 21 October 2004 The whole document, but particularly abstract; page 4, lines 14-22; Experiments 1 and 2; claims 4 and 7.	1-9, 15-38

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] See patent family annex

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 April 2010	- 8 APR 2010
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999	Authorized officer **Julie Christie** AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : 61262832463

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2010/000172

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

X	WO 2006/089121 A2 (KENT SEATECH CORPORATION) 24 August 2006 The whole document, but particularly paragraphs [0048]-[0051], [0067]-[0073]; Example 2; claims 22 and 47	1-9, 15-38
X	GARMORY, H. and TITBALL, R. W., 'ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies', Infection and Immunity, 2004, vol. 72, no. 12, pages 6757-6763 Page 6760, column 2, paragraph 2; page 6762, column 1, paragraph 1.	1-9, 15-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/AU2010/000172

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
WO	2002034773	AU	95795/01	CA	2426738	EP	1330473
		US	2004116661	US	2009280141		
WO	2004089408	US	2004241190				
WO	2006089121	US	2009162401				

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 39/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/10	
Ａ６１Ｋ 39/106	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/106	
Ａ６１Ｋ 39/085	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/085	
Ａ６１Ｋ 39/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/08	
Ａ６１Ｋ 39/112	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/112	
Ａ６１Ｋ 39/118	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/118	
Ａ６１Ｋ 39/102	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/102	
Ａ６１Ｋ 39/104	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/104	
Ａ６１Ｋ 39/108	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/108	
Ａ６１Ｋ 39/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/04	
Ａ６１Ｋ 39/295	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/295	
Ａ６１Ｋ 39/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/12	
Ａ６１Ｋ 39/39	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/39	
Ａ６１Ｋ 47/26	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/26	
Ａ６１Ｋ 47/42	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/42	
Ａ６１Ｋ 47/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/02	
Ａ６１Ｋ 47/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/12	
Ａ６１Ｋ 47/22	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/22	
Ａ６１Ｋ 47/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18	
Ａ６１Ｋ 47/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/10	
Ａ６１Ｋ 47/36	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/36	
Ａ６１Ｐ 31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ 31/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12	
Ａ６１Ｐ 37/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04	
Ａ６１Ｋ 39/215	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/215	
Ａ６１Ｋ 39/17	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/17	
Ｃ１２Ｐ 21/02	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ブロウニング グレン フランシス
オーストラリア国 ブイアイシー ３０９０ ムーニー ポンズ イグリントン ストリート ７８
(72)発明者 マークハム フィリップ フランシス
オーストラリア国 ブイアイシー ３１２９ モント アルバート ノース エルガー ロード １／５１７
(72)発明者 ツェング チーウェン
オーストラリア国 ブイアイシー ３１４７ アッシュウッド ヘイコート ストリート ２／９

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA32 CA04 DA05 DA06 DA07 DA09 EA04 GA11 HA01
4B064 AG31 AG32 BJ12 CA02 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA01Y AA15X AA15Y AA23X AA23Y AA26X AA26Y AA36X AA36Y

	AA37X	AA37Y	AA41X	AA41Y	AA46X	AA46Y	AA49X	AA49Y	AA55X	AA55Y
	AB01	AC20	BA02	BA14	BA16	CA45				
4C076	AA12	AA24	AA25	AA29	BB01	BB13	BB15	BB16	BB21	BB24
	BB25	BB31	CC07	CC32	CC35	DD22	DD31Z	DD38	DD41Z	DD42Z
	DD60Z	DD66	DD67	EE30	EE41	FF61				
4C085	AA03	AA38	BA07	BA09	BA11	BA12	BA14	BA17	BA18	BA19
	BA20	BA21	BA24	BA45	BA51	BA59	BA71	BA81	BA82	CC07
	DD01	DD02	DD62	EE01	EE03	EE06	FF02	FF03	FF11	FF12
	FF13	FF17	FF18	FF19	FF20	GG01	GG03	GG08	GG10	